

**Alma Mater Studiorum – Università Di Bologna**

**DOTTORATO DI RICERCA**

**Endocrinologia degli animali domestici**

**Ciclo XX**

**Settore scientifico disciplinare di afferenza: VET 02 Fisiologia Veterinaria**

**LA DETERMINAZIONE DEL CORTISOLO NEL PELO  
PER LA VALUTAZIONE DEL BENESSERE ANIMALE**

**Tesi di Dottorato di: Dott.ssa Roberta Viggiani**

**Coordinatore del Dottorato**

**Chiar.mo Prof. Eraldo Seren**

**Relatore**

**Chiar.ma Prof.ssa Giovanna Galeati**

**Correlatore**

**Chiar.mo Prof. Pier Attilio Accorsi**

**Esame finale anno 2008**

# INDICE

INDICE .....	2
ABSTRACT .....	7
IL BENESSERE ANIMALE.....	10
Definizione di benessere animale .....	10
Normative sul benessere animale .....	13
Misurazione del benessere animale .....	18
Indicatori comportamentali.....	19
Test di preferenza .....	19
Avversione e sofferenza .....	20
Privazione di alcuni comportamenti .....	20
Problemi di comportamento e comportamenti anomali.....	21
Indicatori riproduttivi, produttivi e sanitari .....	24
Indicatori fisiologici .....	25
Risposta del sistema nervoso autonomo .....	25
<i>Frequenza cardiaca</i> .....	25
<i>Frequenza respiratoria e temperatura corporea</i> .....	27
Risposta neuroendocrina o di "stress" .....	27
<i>Asse ipotalamico-pituitario-surrenale e simpatico-medullo-surrenalico</i> .....	28
<i>Asse somatotrofico</i> .....	33
<i>Asse gonadotropico</i> .....	35
<i>Asse tirotrofico</i> .....	36
<i>Prolattina</i> .....	36
<i>Altri ormoni</i> .....	37
Valutazione dell'attività enzimatica .....	38
Parametri ematici .....	39
Risposta del sistema immunitario .....	39
OBIETTIVI DELLA RICERCA .....	42
La determinazione del cortisolo nel pelo e nelle feci di gatti e cani.....	43
Scopi.....	43
Materiali e metodi.....	44
Soggetti dello studio .....	44
Raccolta e trattamento del materiale biologico.....	45
Determinazione del cortisolo.....	46
Estrazione dal pelo .....	46
Estrazione dalle feci.....	47
Dosaggio del cortisolo .....	47
Determinazione delle concentrazioni .....	48



Analisi statistica.....	48
Risultati .....	49
Discussione e conclusioni.....	51
GATTI.....	53
Materiali e metodi.....	56
Osservazioni comportamentali e metodologie di campionamento .....	56
Trattamento dei dati.....	66
Comportamento: campionamento a scansione.....	66
Comportamento: campionamento comportamentale e a focale .....	67
Analisi statistica.....	69
Esperimento 1 – Stress e comportamento sociale.....	70
Scopi.....	70
Materiali e metodi.....	70
Ambiente di studio .....	70
Soggetti dello studio .....	72
Osservazioni comportamentali e metodologie di campionamento .....	72
Raccolta e trattamento del materiale biologico.....	73
Metodi di analisi .....	73
Risultati e discussione .....	74
Comportamenti .....	74
<i>Associazioni fra categorie comportamentali</i> .....	74
<i>Differenze tra femmine e maschi</i> .....	74
Dati ormonali.....	74
Associazioni fra categorie comportamentali e concentrazioni ormonali .....	75
Esperimento 2 – Effetti delle postazioni di marcatura sullo stress .....	77
Scopi.....	77
Materiali e metodi.....	77
Ambiente di studio .....	77
Soggetti dello studio .....	80
Disegno sperimentale .....	81
Osservazioni comportamentali e metodologie di campionamento .....	83
Raccolta e trattamento del materiale biologico.....	84
Metodi di analisi .....	85
Analisi statistica.....	85
Risultati e discussione .....	86
Comportamento .....	86
<i>Scansioni</i> .....	86
<i>Differenze comportamentali nei maschi e nelle femmine</i> .....	88
<i>Focali</i> .....	91
<i>Campionamento comportamentale</i> .....	93
Dati ormonali.....	95
<i>Cortisolo fecale</i> .....	95
<i>Differenze tra maschi e femmine</i> .....	95

<i>Differenze fra il primo e il secondo periodo sperimentale</i> .....	96
<i>Cortisolo nel pelo</i> .....	97
<i>Differenze tra maschi e femmine</i> .....	97
<i>Andamento nel tempo</i> .....	97
Esperimento 3 – Differenze comportamentali ed endocrine in relazione alla disponibilit� di spazio .....	99
Scopi .....	99
Materiali e metodi .....	99
Ambiente di studio .....	99
Soggetti dello studio .....	110
Disegno sperimentale .....	112
Raccolta e trattamento del materiale biologico .....	115
Metodi di analisi .....	116
Analisi statistica .....	116
Risultati e discussione .....	116
Dati ormonali .....	116
<i>Differenze tra maschi e femmine</i> .....	116
<i>Steroidi fecali</i> .....	116
<i>Steroidi nel pelo</i> .....	120
Comportamento .....	123
<i>Scansioni</i> .....	123
<i>Focali</i> .....	131
Conclusioni .....	139
CANI .....	142
Esperimento 1 – Confronto tra le concentrazioni di cortisolo nel pelo di cani di propriet� e di canile ..	144
Scopi .....	144
Materiali e metodi .....	144
Ambiente di studio .....	144
Soggetti dello studio .....	145
Raccolta e trattamento del materiale biologico .....	146
Metodi di analisi .....	146
Analisi statistica .....	147
Risultati e discussione .....	147
Esperimento 2 – Modificazioni endocrine e del temperamento in cani di canile sottoposti a percorso educativo .....	151
Scopi .....	151
Materiali e metodi .....	151
Ambiente di studio .....	151
Soggetti .....	151
Disegno sperimentale .....	152
Metodi di analisi .....	155
Analisi statistica .....	155
Risultati e discussioni .....	156
comportamento .....	156
<i>Test di Docilit�</i> .....	156

<i>Addestramento al campo di agility</i> .....	157
<i>Passeggiata</i> .....	158
Dati ormonali.....	159
Esperimento 3 - Effetti dell'arricchimento ambientale nei cani anziani di canile .....	162
Scopi.....	162
Materiali e metodi.....	162
Ambiente di studio .....	162
Soggetti dello studio .....	163
Arricchimento ambientale .....	163
Osservazioni comportamentali .....	164
Parametri fisiologici .....	166
Metodi di analisi .....	167
Analisi statistica.....	167
Risultati e discussione .....	167
Comportamento .....	167
Dati ormonali.....	176
Esperimento 4: Parametri endocrini correlati allo stress durante l'addestramento in cani guida per ciechi .....	179
Scopi.....	179
Materiali e metodi.....	180
Ambiente di studio .....	180
Soggetti dello studio .....	180
Affidamento-Addestramento-Assegnazione.....	181
<i>Affidamento</i> .....	181
<i>Addestramento</i> .....	182
<i>Assegnazione</i> .....	184
Raccolta e trattamento del materiale biologico.....	185
Metodi di Analisi .....	185
Analisi Statistica .....	185
Risultati e discussione .....	186
Esperimento 5: Monitoraggio dell'attività surrenalica di cani da utilità e difesa durante l'addestramento .....	191
Scopi della ricerca .....	191
Materiali e metodi.....	193
Ambiente di studio .....	193
Soggetti dello studio .....	193
Disegno sperimentale .....	194
<i>Addestramento</i> .....	194
<i>Programma IPO-0</i> .....	195
<i>Programma IPO-3</i> .....	196
Raccolta e trattamento del materiale biologico.....	196
Metodi di analisi .....	197
Analisi statistica.....	197
Risultati e Discussione .....	198
Conclusioni.....	206

CONSIDERAZIONI FINALI .....	208
BIBLIOGRAFIA.....	210
Siti internet consultati.....	228
Riferimenti legislativi.....	228

# ABSTRACT

La definizione di “benessere animale” e le modalità di determinazione di tale parametro sono ancora ampiamente dibattute. C’è, però, una generale concordanza sul fatto che una condizione di malessere dia origine a variazioni fisiologiche e comportamentali che possono essere rilevate e misurate. Tra i parametri endocrini, il più studiato è, senza dubbio, il cortisolo, in quanto connesso con l’attivazione dell’asse ipotalamico-pituitario-surrenale in condizioni di stress e quindi ritenuto indicatore ideale di benessere, benché debba essere utilizzato con cautela in quanto un aumento dei livelli di questo ormone non si verifica con ogni tipo di *stressor*. Inoltre, si deve considerare che la raccolta del campione per effettuare le analisi, spesso implica il confinamento ed il contenimento degli animali e può essere, quindi, essa stessa un fattore stressante andando ad alterare i risultati.

Alla luce delle suddette conoscenze gli obiettivi scientifici di questa ricerca, condotta sul gatto e sul cane, sono stati innanzitutto validare il metodo di dosaggio di cortisolo dal pelo e stabilire se tale dosaggio può rappresentare un indicatore, non invasivo, di benessere dell’animale (indice di “stress cronico”). In seguito, abbiamo voluto individuare i fattori di stress psico-sociale in gatti che vivono in gattile, in condizioni di alta densità, analizzando i correlati comportamentali ed ormonali dello stress e del benessere in questa condizione socio-ecologica, ricercando, in particolare, l’evidenza ormonale di uno stato di stress prolungato e la messa in atto di strategie comportamentali di contenimento dello stesso e il ruolo della marcatura visivo-feromonale, inoltre abbiamo effettuato un confronto tra oasi feline di diversa estensione spaziale per valutare come varia lo stress in rapporto allo spazio disponibile.

Invece, nel cane abbiamo voluto evidenziare eventuali differenze dei livelli ormonali tra cani di proprietà e cani di canili, tra cani ospitati in diversi canili e tra cani che vivono in diverse realtà familiari; abbiamo voluto valutare gli effetti di alcuni arricchimenti sui cani di canile ed, infine, abbiamo analizzato cani sottoposti a specifici programmi di addestramento.

Il primo importante ed originale risultato raggiunto, che risponde al primo obiettivo della ricerca, è stato la validazione del dosaggio radioimmunologico di cortisolo in campioni di pelo. Questo risultato, a nostro avviso, apre una nuova finestra sul campo della diagnostica endocrinologica metabolica. Attualmente, infatti, il monitoraggio

ormonale viene effettuato su campioni ematici la cui raccolta prevede un elevato stress (stress da prelievo) per l'animale data l'invasività dell'operazione che modifica l'attività di ipotalamo-ipofisi-surrene e, dunque, provoca repentine alterazioni delle concentrazioni ormonali. Questa metodica offre, quindi, il vantaggio dell'estrema semplicità di raccolta del campione e, in più, il bassissimo costo del materiale utilizzato.

Dalle ricerche condotte sui gatti di gattile sono scaturite preziose indicazioni per future indagini sullo stress e sul comportamento sociale felino. I risultati dell'analisi congiunta del comportamento e delle concentrazioni ormonali hanno evidenziato che la disponibilità di postazioni di marcatura visivo-feromonale ha un effetto positivo sia sugli indicatori comportamentali, sia su quelli ormonali di stress.

I risultati dell'analisi delle concentrazioni di cortisolo, derivanti dal confronto tra sette oasi feline di diversa estensione spaziale hanno permesso di evidenziare un aumento dei livelli dell'ormone inversamente proporzionale allo spazio disponibile.

Lo spazio disponibile, però, non è l'unico fattore da prendere in considerazione al fine di assicurare il benessere dell'animale infatti, nelle colonie che presentavano instabilità sociale e variabilità territoriale il cortisolo aveva valori elevati nonostante le notevoli disponibilità di spazio.

Infine, si è potuto constatare come anche lo stare appartati, aumenti proporzionalmente con l'aumentare dello spazio. Questo comportamento risulta essere molto importante in quanto mitiga lo stress ed è da prendere in considerazione nell'allestimento di colonie feline. Infatti, nelle colonie di dimensioni ridotte dove lo stress è già alto, l'impossibilità dei soggetti di appartarsi può contribuire a peggiorare la situazione; ecco perché si dovrebbero creare luoghi artificiali per fornire ai gatti la possibilità di appartarsi, magari sfruttando gli spazi sopraelevati (tetti, alberi, ecc.).

Per quanto riguarda il confronto tra cani di proprietà e cani di canile non sono state evidenziate differenze significative nei livelli di cortisolo nel pelo mentre abbiamo rilevato che quest'ultimi sono influenzati dalla disponibilità di spazio: infatti sia i cani di proprietà che vivevano in giardino, sia i cani dei canili che praticavano lo sgambamento presentavano livelli di cortisolo nel pelo più bassi rispetto, rispettivamente, ai cani di proprietà che vivevano in appartamento o appartamento/giardino e a quelli di canile che non praticavano lo sgambamento.

L'arricchimento ambientale fornito ai cani di canile ha esercitato un'influenza positiva riducendo i livelli di cortisolo e migliorando la docilità dei soggetti, favorendone un'eventuale adozione.

Si è inoltre messo in luce che i programmi di addestramento, eseguiti con tecniche “gentili”, non comportano situazioni stressanti per l’animale e aiutano i cani ad esprimere doti di equilibrio che rimarrebbero altrimenti celate dagli aspetti più istintivi del carattere. D’altra parte, l’impegno agonistico prima di una competizione e il livello di addestramento raggiunto dai cani, influenzano le concentrazioni di cortisolo a riposo e durante l’esercizio fisico.

Questi risultati possono sicuramente dare utili suggerimenti per la gestione e la cura di gatti e cani al fine di migliorarne le condizioni di benessere.

# IL BENESSERE ANIMALE

## DEFINIZIONE DI BENESSERE ANIMALE

Il modo di intendere il rapporto uomo-animale ha subito un mutamento particolarmente evidente nei confronti degli animali d'affezione, ma anche in altri settori i cambiamenti avvenuti con l'affermarsi degli allevamenti intensivi e con lo sviluppo delle biotecnologie hanno raggiunto una dimensione tale da costringere a stabilire limiti e parametri per rendere gli effetti degli interventi umani sulla vita animale accettabili.

Il rispetto delle esigenze animali diviene, quindi, una richiesta morale, espressione di un valore di civiltà che valuta in termini di responsabilità il rapporto di dominio e di sfruttamento, instaurato dall'uomo fin dai tempi della domesticazione, ma interpretato oggi in direzioni sempre più complesse e variegate.

Fra i primi interrogativi che si sono posti all'attenzione ci sono senz'altro quelli sul significato e sul valore del benessere animale.

Il benessere animale, infatti, sembra rappresentare una sorta di cartina di tornasole per comprendere le modalità con cui viene gestito il rapporto con l'animale.

Cosa si intende in realtà con il termine benessere animale? Il concetto di benessere animale si è andato profondamente modificando nel tempo, parallelamente con il modificarsi della sensibilità della popolazione nei confronti della vita animale e con l'affermarsi della richiesta etica del consumatore di ricevere alimenti non soltanto salubri e sicuri ma ottenuti rispettando le esigenze fisiche e psichiche dei soggetti allevati. Ammesso che sia possibile indicare una data di nascita delle problematiche connesse al benessere animale, la più plausibile sarebbe la pubblicazione nel 1965, in Inghilterra, del Rapporto Brambell. Questo rapporto fu commissionato dal governo inglese ad un gruppo di ricercatori (tra i cui membri vi era un veterinario) a causa del grande impatto ed interesse che aveva suscitato nell'opinione pubblica la pubblicazione nel 1964 del libro di Ruth Harrison "*Animal machines*" che sollevava la questione del benessere degli animali allevati intensivamente. Oltre ad essere uno dei primi documenti ufficiali relativi al benessere animale, vi si parla per la prima volta del principio delle "cinque libertà" per la tutela del benessere animale riprese nel 1979 dal "British Farm Animal Welfare Council" (FAWC) ([www.fawc.org.uk](http://www.fawc.org.uk)):



- **libertà dalla fame, dalla sete e dalla cattiva nutrizione**, mediante facile accesso all'acqua fresca e a una dieta in grado di favorire lo stato di salute;
- **libertà di avere un ambiente fisico adeguato**, comprendente ricoveri e una zona di riposo confortevole;
- **libertà dalle ingiurie, malattie, ferite e traumi**, attraverso la prevenzione o la rapida diagnosi e la pronta terapia;
- **libertà di manifestare le caratteristiche comportamentali specie-specifiche normali**, fornendo spazio sufficiente, locali appropriati e la compagnia di altri soggetti della stessa specie;
- **libertà dal timore**, assicurando condizioni che evitino sofferenza mentale.

Nel 1986, D. Broom (*Professor of Animal Welfare, Department of Clinical Veterinary Medicine – University of Cambridge, UK*) definisce il benessere come lo stato conseguente ai risultati, positivi o meno, delle strategie messe in atto dall'animale per adattarsi all'ambiente. I fallimenti e le difficoltà nel rapportarsi al proprio ambiente sono indicatori di scarso benessere. Tra questi menzioniamo:

- la ridotta aspettativa di vita;
- il peggioramento della crescita e delle funzioni riproduttive;
- la presenza di traumi e ferite;
- la maggiore suscettibilità alle malattie;
- i comportamenti anomali.

Negli anni '90 lo stesso Broom (1991, 1996, 1998) e altri (Broom e Johnson, 1993), pongono in evidenza il ruolo e l'importanza dei sentimenti nel determinare lo stato di benessere e definiscono il *welfare* come una caratteristica dell'animale e non qualcosa che gli viene fornito dall'esterno; esso può variare da ottimo a pessimo e si può misurare in modo scientifico; tale misurazione si deve basare sulla conoscenza della biologia delle specie e, in particolare, dei metodi usati dagli animali per tentare di adattarsi all'ambiente. Inoltre, va tenuto presente che dolore e sofferenza sono aspetti importanti del *welfare*. La definizione si arricchisce così di un elemento ulteriore tanto che, nel complesso, lo stato di benessere è valutabile attraverso indicatori relativi alle più diverse manifestazioni biologiche.

Se, quindi, fino agli anni '80 il benessere animale è stato inteso sostanzialmente come "l'assenza di malattia" e l'insieme delle condizioni necessarie a garantire la più alta produttività degli animali da reddito, a partire dagli anni '90 lo si è cominciato a intendere

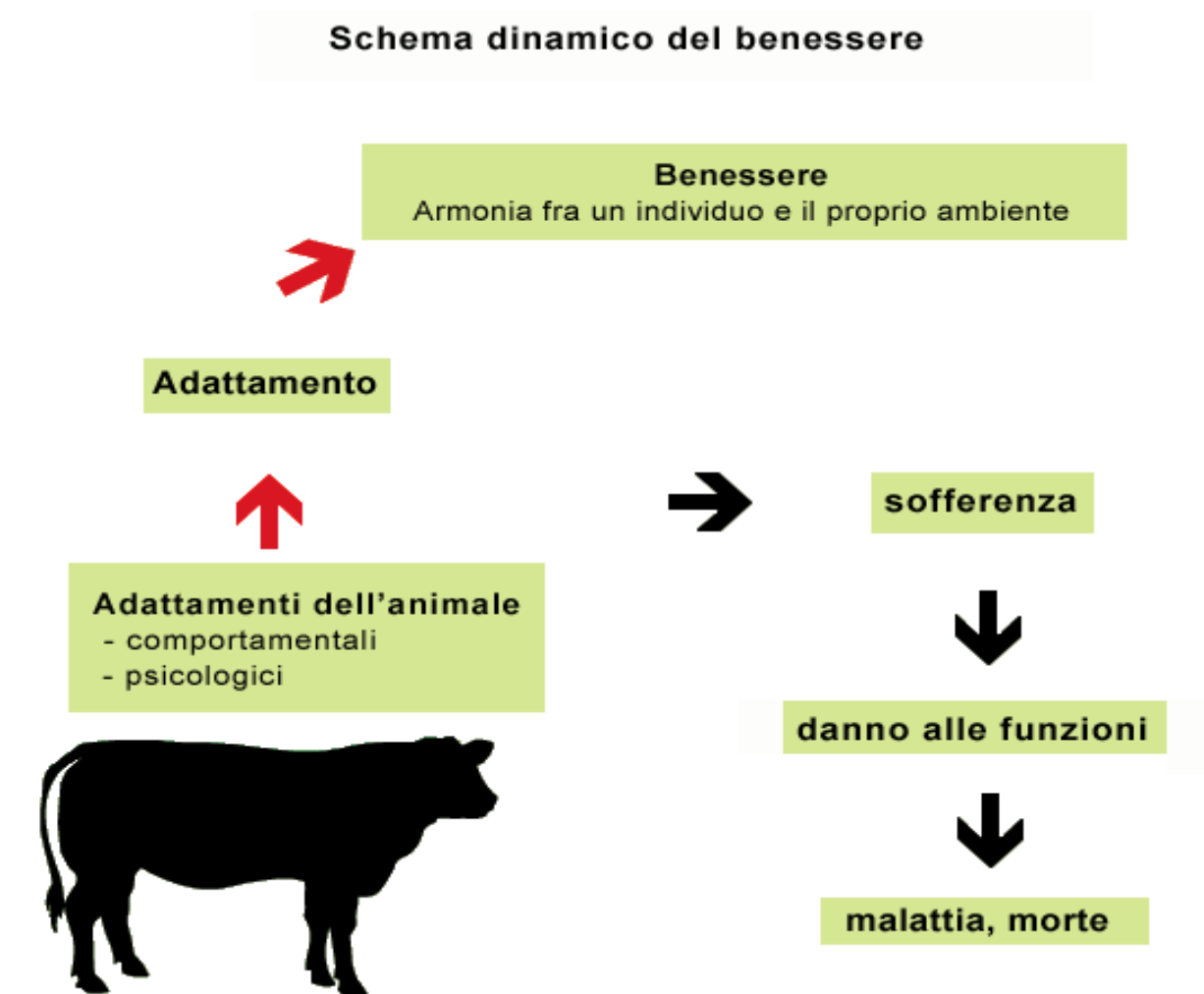
come “salute globale” cioè come l’insieme delle condizioni psico-fisiche positive per la sussistenza della vita animale, come stato di completa salute fisica e mentale dove l’animale è in totale armonia con il suo ambiente (Hughes e Duncan, 1988).

Lorz (1973) e Van Putten (1973) danno una definizione di “benessere” simile a questa, ma includendo come condizione che l’ambiente circostante l’animale debba essere “tale da permettere l’adattamento dell’animale stesso”. Secondo Van Putten, infatti, l’uomo è responsabile della qualità dell’ambiente in cui gli animali vengono allevati e tale ambiente deve permettere all’animale di adattarsi: secondo l’Autore, l’ambiente naturale stesso non offre agli animali condizioni ideali di vita, ma dal momento in cui l’uomo ha deciso di togliere un animale dal suo ambiente originario e di allevarlo per ottenerne benefici, diventa responsabile dell’ambiente in cui lo alleva e la responsabilità del suo benessere ricade su di lui.

E’ interessante notare che fin dall’inizio le problematiche del benessere animale sono caratterizzate da un intreccio fra informazioni e atteggiamenti ricavati dalla ricerca in campo scientifico, e informazioni e atteggiamenti ricavati dalla ricerca in campo morale. Sicuramente la definizione scientifica del ‘benessere’ non ha ancora trovato una proposta univoca, ma proprio per questo le ricerche si sono moltiplicate, affrontando tutti gli aspetti del problema e gli approcci possono essere diversificati (Appleby e Hughes, 1997). Agli estremi di questi vi sono sostanzialmente due posizioni di partenza (Hetts, 1991), che si possono riassumere in:

- l’analisi esclusivamente di variabili oggettive e quantificabili, evitando di considerare lo ‘stato mentale’ dei soggetti in quanto non sottostà a tale principio metodologico;
- la considerazione che le sensazioni degli animali sono molto simili a quelle umane e quindi gli animali, specialmente d’affezione, vengono visti in modo piuttosto antropomorfo.

Questi punti di vista estremi non sono tuttavia esclusivi, in quanto vi sono posizioni intermedie che, pur mantenendo un rigoroso livello di oggettività e di scientificità, non escludono la possibilità di conoscere più a fondo, oltre alle variabili quantificabili, quali gli indicatori di adattamento, anche caratteristiche percettivo-emozionali di specie diverse dalla nostra.



**Figura 1:** Schema dinamico del benessere animale ([www.civ-viande.org/it/ebn.ebn?pid=57&rubrik=1&item=6&page=7](http://www.civ-viande.org/it/ebn.ebn?pid=57&rubrik=1&item=6&page=7))

## NORMATIVE SUL BENESSERE ANIMALE

La prima testimonianza di diritto che riguarda specificatamente gli animali è stata sancita nel 1641 nel Massachussettes. Essa afferma che *"Nessun uomo può esercitare alcuna tirannia o crudeltà verso gli animali tenuti dall'uomo per il proprio utilizzo"* e scaturisce, da un lato dalla vocazione animalista dei colonizzatori inglesi, dall'altro dal contatto quotidiano con gli animali da parte dei nativi ([www.ministerosalute.it](http://www.ministerosalute.it)).

Durante l'ultimo secolo scienziati, umanisti, zoofili, giuristi, sociologi e politici sono stati sollecitati ad affrontare il problema della tutela della vita animale nella società. Ne è scaturito un ampio dibattito mondiale dagli elevati contenuti etici, scientifici e politici che ha condotto alla Dichiarazione Universale dei Diritti dell'Animale (L.I.D.A.) proclamata il 15 ottobre 1978 nella sede dell'Unesco a Parigi ([www.mclink.it/assoc/lida/carta.htm](http://www.mclink.it/assoc/lida/carta.htm)).

Anche se la Dichiarazione Universale sui diritti dell'Animale non ha alcun valore sul piano giuridico-legislativo, aver avvertito la necessità di confrontarsi su questo argomento rappresenta, per ogni persona e Paese, un passo avanti ed una scelta di civiltà.

La prima delle normative europee che, seppure senza menzionarlo, affronta il tema del benessere animale è stata la Convenzione europea sulla protezione degli animali da allevamento adottata a Strasburgo il 10 marzo 1976 e ratificata dall'Italia il 14 ottobre 1985 con la legge n. 623. Vi si legge tra l'altro che "Ogni animale deve beneficiare di un ricovero, di un'alimentazione e di cure che, tenuto conto della specie, del suo grado di sviluppo, d'adattamento e di addomesticamento, siano appropriate ai suoi bisogni fisiologici ed etologici conformemente all'esperienza acquisita ed alle conoscenze scientifiche".

Negli ultimi 25 anni, sono state emanate numerose disposizioni che confermano i diritti degli animali estendendo la disciplina legislativa ad ogni aspetto del rapporto con l'uomo e ad ogni fase dell'utilizzazione degli animali da parte dell'uomo.

Siamo ancora nell'ambito di indicazioni di carattere generale, ma si è così iniziato un percorso che ha prodotto e sta producendo a livello Europeo, Nazionale, Regionale, ecc., normative sempre più precise e specifiche. Ciò nell'ambito degli animali d'allevamento, d'affezione e selvatici.

Il progresso e la maturazione di una coscienza zoofila, che senta davvero come impegno etico la tutela del benessere degli animali e la loro difesa dai maltrattamenti, è un processo certamente graduale e molto lento che, per il nostro Paese, si è attivato in tempi molto recenti e che ha trovato un avvio decisivo in prese di posizione assunte in altre nazioni europee e arrivate a noi come normativa Cee e Ue.

Dai tempi della Convenzione di Strasburgo, accolta inizialmente con scetticismo anche in ambienti veterinari, le normative via via emanate hanno effettivamente migliorato le condizioni di benessere degli animali e il nostro codice penale contiene oggi norme più incisive e articolate per sanzionare il maltrattamento degli animali.

In particolare, per quanto riguarda il settore degli animali da reddito, esistono numerose normative, emanate dalle istituzioni comunitarie, concernenti la protezione degli animali negli allevamenti, la macellazione ed il trasporto.

La normativa generale sulla protezione degli animali negli allevamenti (direttiva 98/58/CE recepita a livello nazionale con D.Lgs. 146/2001) definisce le norme minime per la protezione degli animali allevati o custoditi per la produzione di derrate alimentari, lana, pelli, pellicce o per altri scopi agricoli.

Personale adeguatamente qualificato e strutture idonee sono i presupposti essenziali per attuare sistemi di allevamento delle specie da reddito rispettosi delle necessità anche comportamentali degli animali.

Riguardo al personale e alla gestione dell'allevamento, i punti più salienti indicati dalla direttiva, possono essere così sintetizzati: il personale, deve essere adeguato sia per numero che per capacità e competenze professionali; agli animali deve essere garantita un'alimentazione sana e in quantità sufficiente; a seconda del tipo di allevamento occorre effettuare un controllo giornaliero o periodico degli animali, tenere un registro di ogni trattamento medico effettuato e del numero di casi di mortalità constatati.

Riguardo agli aspetti più strutturali degli allevamenti, si evidenzia la necessità di cercare soluzioni che non limitino la libertà di movimento dell'animale, ma nel caso in cui l'animale sia continuamente o regolarmente legato, si deve almeno garantire uno spazio adeguato alle sue esigenze fisiologiche. Le attrezzature devono essere costruite e mantenute in modo che non vi siano spigoli taglienti, quelle per la somministrazione di mangimi e di acqua devono essere concepite in modo da ridurre al minimo le possibilità di contaminazione degli stessi e poter essere accuratamente pulite e disinfettate.

I materiali utilizzati per le attrezzature e la costruzione dei locali di stabulazione non devono essere nocivi; nei locali di stabulazione la circolazione dell'aria, la quantità di polvere, la temperatura, l'umidità relativa dell'aria e le concentrazioni di gas devono essere mantenute entro limiti non dannosi per gli animali e occorre valutare anche la quantità e la qualità di luce alla quale gli animali sono sottoposti.

Oltre alla normativa generale ne sono state emanate di specifiche che dettagliano gli standard minimi per la protezione delle galline ovaiole (Dir. CEE 1999/74 e 2002/4 recepite con il D.Lgs. 267/2003), dei vitelli (Dir. CE 91/629 così come modificata ed integrata dalla Dir. CE 2/1997, recepite rispettivamente dal D.Lgs. 533/1992 e dal D.Lgs. 331/1998) e dei suini (Dir. CE 91/630 così come modificata ed integrata dalla Dir. CE 88/2001 e Dir. CE 93/2001, recepite rispettivamente dal D.Lgs. 534/1992 e dal D.Lgs. 53/2004).

Gli studi condotti dimostrano che animali ben accuditi e liberi di comportarsi secondo natura sono più sani di quelli trattati in modo inadeguato. Cresce la mole di dati (raccolti a partire dagli anni settanta) che illustra come condizioni protratte di stress fisico (ad esempio derivanti dalle condizioni di ricovero) influiscano non soltanto sul comportamento degli animali ma anche sulla loro fisiologia e possano determinare stati prepatologici o addirittura patologici. Inoltre, sono in corso indagini intese a sviluppare e

standardizzare delle metodologie atte a misurare scientificamente il grado di benessere degli animali (Blokhuis et al. 2003).

Nel frattempo, gli studi sono passati a esaminare anche il nesso esistente tra vari fattori che agiscono sul benessere degli animali e la qualità dei prodotti ottenuti da questi ultimi (ad esempio, tra le condizioni di trasporto e nei macelli da un lato e la qualità della carne dall'altro). Il meccanismo mediante il quale i disagi durante il trasporto influiscono sulla salute degli animali è estremamente complesso. Meglio noti con il nome di "sindrome della febbre da trasporto", tali disagi possono deprimere il sistema immunitario durante e dopo il trasporto. Ciò comporta una maggiore predisposizione alle infezioni per l'abbassamento della soglia di infezione (vale a dire della quantità di agenti patogeni necessaria a provocare uno stato di malattia).

Vari agenti patogeni (microbi, virus e parassiti), innocui ove le condizioni di allevamento siano adeguate, possono diventare aggressivi, proliferare e provocare malattie in animali che siano stati trasportati di recente. Lo stress da trasporto può riattivare agenti patogeni presenti in forma latente (asintomatica) in animali vettori e provocarne l'escrezione, inducendo così uno stato di malattia conclamata in altri animali. Tutto questo comporta ancora una volta un aumento dei tassi di morbidità e di mortalità. Secondo un parere recente del Comitato scientifico dell'UE per la salute e il benessere degli animali, lo stress da trasporto può accrescere sia il livello sia la durata dell'escrezione di agenti patogeni da parte di animali infetti a livello subclinico, rendendoli pertanto maggiormente contagiosi.

Cresce dunque la consapevolezza del nesso tra benessere e salute degli animali e anche, per estensione, tra benessere degli animali e sicurezza alimentare.

Per quanto riguarda il benessere degli animali da affezione alcune indicazioni ci sono fornite dalla Legge n. 281 (Legge quadro in materia di animali di affezione e prevenzione del randagismo) che disciplina la tutela degli animali di affezione, condanna gli atti di crudeltà contro di essi, i maltrattamenti ed il loro abbandono, al fine di favorire la corretta convivenza tra uomo e animale. Inoltre il DL N°116 del 27/01/1992 e la Delibera della Giunta regionale dell'Emilia Romagna N° 394 del 27/03/2006, danno indicazioni sulla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici e sulle condizioni di benessere da adottare in negozi, pensioni, allevamenti e durante le esposizioni.

E' interessante rilevare che le leggi nazionali, regionali e i regolamenti comunali sono arrivati ad accettare e ad enfatizzare anche l'importanza della convivenza uomo

animale, riconoscendo un ruolo curativo e didattico agli animali stessi (*pet-therapy*, animali nelle scuole, attività assistite per gli anziani).

Su questa linea si pone l'accordo siglato il 6 febbraio 2003, in sede di Conferenza Stato Regioni, tra il Ministero della Salute, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano e recepito con DPCM 28/2/2003 dal Consiglio dei Ministri. L'accordo definisce alcuni principi fondamentali rivolti a realizzare una maggiore e sempre più corretta interrelazione tra uomo e animali da compagnia, assicurare in ogni circostanza il loro benessere, evitare che siano utilizzati in modo riprovevole e favorire lo sviluppo di una cultura di rispetto per la loro dignità anche nell'ambito delle realtà terapeutiche innovative come la *pet-therapy*.

E' stato attivato dal Ministero della salute un "Centro di riferimento nazionale per il benessere animale" presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna.

L'articolazione delle funzioni e delle competenze del Centro di Riferimento Nazionale per il Benessere Animale possono essere riassunte come segue:

- attività di consulenza per tutti gli operatori del settore e per le Autorità Veterinarie;
- messa a punto e stesura di linee-guida sul benessere animale;
- messa a punto, utilizzazione e diffusione di strumenti idonei alla valutazione del benessere animale, in relazione alla specie, ai metodi di gestione ed alle tecnologie di allevamento;
- partecipazione attiva ai gruppi di lavoro nazionali e Comunitari, sulla base di una propria autorevole attività di elaborazione scientifica nel settore;
- fornire assistenza, informazione specialistica e aggiornamenti agli enti ed alle strutture che operano nel settore;
- organizzare e supportare la formazione e l'aggiornamento per gli operatori di differenti livelli;
- esecuzione di test immunologici, ematologici e chimico-clinici validati per una valutazione del benessere animale e messa a punto di test innovativi sulla base delle più recenti acquisizioni scientifiche;
- una attività di ricerca di base nelle discipline fondamentali della etologia, neuro-endocrinologia, psico-neuro-immunologia, promossa anche in collaborazione con centri Comunitari e di Paesi terzi;

- la validazione di campo di schemi di intervento per la valutazione del benessere animale;
- lo studio e la validazione di pratiche rispettose del benessere degli animali e della sicurezza alimentare, alternative alla chemioprophilassi.

## MISURAZIONE DEL BENESSERE ANIMALE

Da un punto di vista scientifico e pratico appare necessario stabilire metodi e parametri oggettivi per una corretta valutazione del benessere, ma, come già detto in precedenza a proposito della definizione di benessere, anche nei criteri di valutazione le divergenze sono notevoli.

La valutazione del benessere coinvolge una serie di risposte che l'animale mette in atto per adattarsi all'ambiente in cui si trova. Infatti, l'organismo risponde alle varie situazioni ambientali non solo con cambiamenti comportamentali, primi e precoci segni di necessità di adattamento, ma anche con meccanismi fisiologici ed immunitari, che possono avere ripercussioni sullo stato di salute e sull'accrescimento (Selye, 1936).

Per questo motivo gli studi effettuati in merito sempre più frequentemente prendono in considerazione una serie di parametri che vengono comunemente chiamate "indicatori" di adattamento.

Il loro utilizzo può consentire di evidenziare eventuali problemi di stress acuto e/o cronico che nel tempo possono avere effetti negativi anche sulle produzioni animali.

Tutti i sistemi fin qui studiati sono basati su una gamma di parametri di valutazione, che possono essere distinti in due categorie:

- parametri relativi agli animali, i quali misurano la reattività e la capacità di adattamento a specifici ambienti (ad es. parametri fisiologici, comportamentali e sanitari);
- parametri relativi all'ambiente d'allevamento ed alla sua gestione (ad esempio le dimensioni e le caratteristiche delle strutture, come pavimentazioni, microclima, pulizia, utilizzate per l'allevamento, la qualità della lettiera, la numerosità dei gruppi di animali).

E' bene però tenere in considerazione che la valutazione del benessere animale attraverso questi parametri presenta alcuni limiti, in quanto:

- la variabilità entro i parametri è grande a causa dell'influenza di numerosi fattori quali razza, stato di produzione e altri, senza escludere la variabilità individuale;



- non esiste un sistema generale di riferimento provvisto di valori soglia e quindi non è possibile stabilire correttamente quali disturbi possano essere considerati normali e quali no (anche in condizioni ottimali di benessere si possono manifestare malattie);
- le misure dirette del benessere animale necessitano di molto tempo, personale qualificato ed attrezzature specifiche;
- la generalizzazione dei risultati e delle conclusioni è limitata ai soli sistemi confrontabili, vale a dire a quei sistemi di allevamento che operano in condizioni standard (suini e polli).

Di seguito verrà analizzata la validità di alcuni indici potenziali dello stato di benessere degli animali.

---

## INDICATORI COMPORTAMENTALI

Le misure comportamentali hanno il vantaggio di essere molto sensibili, specifiche e di variare con l'intensità della costrizione imposta all'animale. Esse permettono di prevenire l'apparizione di problemi patologici, in quanto i ritmi d'attività sono modificati prima dello stato sanitario e della produzione e di rivelare delle piccole variazioni anche quando le misure fisiologiche non variano. La specificità delle misure comportamentali permette di individuare il tipo di problema (le posture di riposo danno informazioni sullo spazio disponibile, le attività orali non nutritive sulla mancanza di attività); inoltre, in alcuni casi, la frequenza di un comportamento è legata all'intensità della costrizione.

---

## TEST DI PREFERENZA

Dal momento che il benessere dell'animale dipende dal modo in cui quest'ultimo percepisce il proprio ambiente, risulta indispensabile conoscere le sue preferenze o, al contrario, le sue avversioni. Ciò può essere fatto offrendogli la possibilità di determinare da solo le proprie condizioni ambientali attraverso un compito specifico. Questo test è più valido quando utilizzato per rispondere a questioni relativamente specifiche come il tipo di pavimento o di cibo. Ad esempio, dando agli animali la possibilità di accendere o spegnere la luce interrompendo un fascio di raggi infrarossi è stato dimostrato che il tempo di luce artificiale percepito come ottimale è di 15 ore per i suini, 16 per i vitelli e 18,5 per le pecore ([www.civ-viande.org/it/ebn.ebn?pid=57&rubrik=1&item=6&page=7](http://www.civ-viande.org/it/ebn.ebn?pid=57&rubrik=1&item=6&page=7)).

La forza di una preferenza determina se può essere vista come un bisogno; ciò può essere valutato registrando l'entità dei comportamenti anormali e degli stress fisiologici che si determinano quando la preferenza espressa viene negata e misurando le energie che l'animale è disposto a spendere per ottenerla. Tuttavia, anche la valutazione delle preferenze ha i suoi limiti. In particolare, gli animali rispondono spesso con scelte a breve termine, mentre sappiamo che un elemento giudicato positivo nell'immediato può rivelarsi nocivo a lungo termine.

---

## AVVERSIONE E SOFFERENZA

Le norme etiche applicate agli animali esigono che ogni inutile sofferenza sia evitata.

L'esperienza umana mostra che la sofferenza può derivare da paura, frustrazione, ansia e dolore, stati emozionali molto differenti che si cerca di evitare o di fronte ai quali si preferisce fuggire. L'avversione ad un particolare trattamento può essere definita in base all'intensità con la quale l'animale tenta di fuggire da esso. Un altro modo di quantificare l'avversione a un trattamento è il prezzo che un animale è disposto a pagare per evitarlo.

Alcune tecniche di avversione-apprendimento sono state usate per i polli, i bovini, le pecore, i suini e gli animali da compagnia e rappresentano la misura più diretta disponibile per le sofferenze di breve durata. Non tutte, però, si sono dimostrate valide nel discriminare tra trattamenti e non è stata ancora dimostrata la loro utilità nella misurazione delle sofferenze croniche (Biagi *et al.*, 2002).

---

## PRIVAZIONE DI ALCUNI COMPORTAMENTI

I sistemi di allevamento intensivo spesso impediscono all'animale di praticare certi tipi di comportamento che vengono regolarmente osservati in condizioni meno restrittive. Per esempio, le galline ovaiole non possono costruire il nido, allargare e sbattere le ali, fare bagni di terra; le scrofe in gestazione non possono costruire il nido né praticare la locomozione tipica dei momenti che precedono il parto; le gabbie per vitelli spesso non sono abbastanza larghe da permettere il normale comportamento di toilettatura e certe posizioni di riposo. Ciò è valido anche per il cane ed il gatto che spesso si trovano a viveri in ambienti ristretti e privi di stimoli.

L'impedimento del normale comportamento è un chiaro segnale di benessere animale compromesso, ma è evidente che bisogna dimostrare che l'uno comporta la riduzione dell'altro. L'importanza di un determinato comportamento può essere esaminato misurando le conseguenze fisiologiche della privazione del comportamento stesso.

Ad esempio, i vitelli che dopo il pasto continuano a succhiare la tettarella di gomma, fanno registrare un elevato picco di insulina e la secrezione alterata di colecistochinina rispetto ai vitelli che bevono il latte dal secchio. La mancanza di bagni di terra fa accumulare il grasso sulle penne delle galline favorendone il deterioramento.

Vi sono alcune evidenze sperimentali che indicano che gli animali rimangono motivati a praticare certi comportamenti anche quando l'ambiente fisico lo impedisce. Una di queste è la manifestazione di certi comportamenti in forma alterata o in un contesto non usuale (Biagi *et al.*, 2002).

Ad esempio, nelle galline allevate in gabbia si possono qualche volta osservare le sequenze delle azioni tipiche dei bagni di terra o della costruzione del nido. I vitelli separati dalla madre continuano a succhiare parti del recinto e parti del loro corpo. Un'altra evidenza è la manifestazione di comportamenti cosiddetti "appetitivi". Gli etologi fanno una distinzione semplicistica, ma utile tra comportamenti "consumatori" che hanno un obiettivo funzionale, come l'assunzione di cibo, e comportamenti "appetitivi", che sono preliminari ai primi, come la ricerca del cibo. Le scrofe e i volatili domestici mostrano simili atteggiamenti.

Nonostante le difficoltà di interpretazione, alcuni risultati di queste sperimentazioni sono utili a fornire informazioni necessarie a comprendere se determinati comportamenti derivano da motivazioni interne. Tuttavia, al momento, non è stato ancora dimostrato che impedire agli animali di praticare particolari comportamenti causi sofferenza e solo in pochi casi è stato verificato che la privazione di alcuni comportamenti ha un effetto sulle funzioni biologiche (Biagi *et al.*, 2002).

---

## PROBLEMI DI COMPORTAMENTO E COMPORTAMENTI ANOMALI

E' opinione di molti che differenti stati di benessere si manifestino attraverso differenze di comportamento. Alcuni cambiamenti nel comportamento sfociano in atteggiamenti non desiderati (il morso della coda nei maiali, il beccare le penne nei polli,

il succhiarsi a vicenda nei vitelli, il girare intorno mordendosi la coda del cane) (Duncan e Wood-Gush, 1971).

Gli animali ben adattati al proprio ambiente raramente perdono tempo ed energie in attività che non contribuiscono al loro buono stato riproduttivo e tali animali sono capaci di adeguare il loro comportamento ai normali cambiamenti del proprio ambiente. La mancata possibilità di soddisfare i bisogni primari e la mancanza di controllabilità/predicibilità dell'ambiente potrebbero essere all'origine di un inadeguato processo di adattamento e dar luogo a dei comportamenti anomali come stereotipie, attività sostitutive, comportamenti ridiretti e apatia (Hetts, 1991).

**Stereotipie:** “La stereotipia è una sequenza relativamente invariata di movimenti che avviene tanto frequentemente in un particolare contesto che non può essere considerata come facente parte di uno dei normali sistemi funzionali degli animali” (Broom, 1988).

Le stereotipie possono essere messe in atto attraverso diversi moduli comportamentali; per esempio, i cani possono girare in circolo o inseguirsi la coda (Moberg, 2000), le scrofe possono mordere le sbarre del recinto o del box (Fraser, 1975) e gli animali rinchiusi nelle gabbie degli zoo percorrono sempre la stessa traiettoria (Meyer-Holzapfel, 1968). La causa esatta della stereotipia non è stata definita in modo preciso, ma sembra che le situazioni in cui gli animali vengono mantenuti in un ambiente monotono (privo di stimoli), possano favorire l'insorgenza di questi comportamenti.

E' probabile che animali che tendono a reagire in modo attivo alle situazioni spiacevoli siano maggiormente predisposti a sviluppare stereotipie rispetto a soggetti più passivi (Hetts, 1991). Una spiegazione possibile dell'origine di questi comportamenti è che essi siano evoluti a partire da un iniziale tentativo di fuggire e poi siano diventati ritualizzati e ripetitivi.

Se oltre il 10% del tempo viene speso dall'animale in tali comportamenti, il suo benessere sarebbe compromesso. Molti, però, sono i risultati contraddittori che indeboliscono questa affermazione. Viene fatto solo qualche esempio: alcuni studi indicano che in animali con atteggiamenti stereotipati sono stati trovati una maggiore attività della corteccia surrenale, un aumento delle lesioni polmonari e una ridotta prolificità, il che farebbe supporre che questi animali sono sotto stress. Altri studi, invece, non avrebbero trovato differenze nella produzione di cortisolo e nell'attività del sistema nervoso simpatico, confrontando animali con atteggiamenti stereotipati e non. Altri Autori

ipotizzano, sulla base della presenza di un'attività oppioide, che la messa in atto di comportamenti stereotipati abbia l'effetto di ridurre lo stress. Questa teoria è largamente dibattuta e non sembra applicabile a tutti i tipi di stereotipie (Rushen, 1993).

**Attività sostitutive** (*displacement activities*): sono comportamenti messi in atto senza una rilevanza funzionale. Questi comportamenti possono essere generati da situazioni di conflitto in cui l'animale “vuole fare qualcosa, ma non può farlo”. Stimoli ambientali percepiti come spiacevoli o pericolosi possono causare nell'animale un conflitto interno il cui risultato può essere un comportamento “fuori contesto” (Troisi, 2002). Ad esempio, quando un cane è altamente motivato ad avere accesso ad una determinata risorsa o a fuggire, ma non può mettere in atto questo comportamento – l'accesso al cibo o ad una femmina in calore o alla libertà gli vengono impediti da un altro cane, dal proprietario, dalla rete di un recinto – la risposta alla situazione può essere leccarsi una zampa od un fianco. Il “leccarsi insistentemente le zampe” è un comportamento di sostituzione spesso osservato in animali confinati in ambienti poveri di stimoli o sottoposti a situazioni di stress. Le attività di sostituzione, se messe in atto frequentemente, possono essere considerate un segno di frustrazione e, di conseguenza, di malessere dell'animale (Troisi, 2002).

**Comportamenti ridiretti**: sono rivolti verso stimoli che non sono direttamente legati alla situazione o allo stimolo che li genera dal punto di vista motivazionale. Ad esempio, un gatto che non può cacciare un uccello che vede volare fuori dalla finestra, perché c'è un vetro che glielo impedisce, può “ridirigere” il colpo di zampa verso un altro oggetto o essere vivente. Alcuni comportamenti aggressivi possono essere comportamenti ridiretti. Mettere in atto questi comportamenti può causare danni agli animali e alle persone vicine ed a volte anche all'animale stesso (se per esempio l'oggetto che si muove nelle vicinanze è la propria coda).

Come per le attività di sostituzione, i comportamenti ridiretti possono essere considerati sintomi di malessere quando sono messi in atto frequentemente e per lunghi periodi di tempo (Broom e Johnson, 1993).

**Apatia**: una notevole diminuzione della risposta a stimoli che generalmente causano una qualche reazione in situazioni normali, può essere sintomo di malessere.

Il benessere degli animali che hanno scarso o nullo comportamento esplorativo, che non rispondono a stimoli sociali o che rimangono persino indifferenti di fronte ad una

situazione estremamente avversa, è probabilmente molto compromesso (Broom e Johnson, 1993). Questa mancanza di risposte, a volte, può essere paragonata alla depressione umana e dovrebbe essere considerata come la conseguenza di una grave perdita della capacità di adattamento in generale. Questo tipo di comportamento apatico si può manifestare per esempio nel cane in seguito alla perdita di un importante compagno, sia umano che canino, in scrofe obbligate all'isolamento per lunghi periodi in piccoli recinti o legate (van Putten, 1980; Wiepkema *et al.*, 1983), oppure in altri animali da reddito o da zoo tenuti in condizioni inadeguate.

---

## INDICATORI RIPRODUTTIVI, PRODUTTIVI E SANITARI

Secondo alcuni autori la migliore stima dello stato di salute di un animale è data dall'analisi dei parametri riproduttivi dell'intero arco di vita.

Negli animali selvatici, ma anche nei domestici, il ritardo o la mancata possibilità di riprodursi, possono essere dovuti alla fame; ma anche quando il cibo è sufficiente, l'animale potrebbe essere così turbato dalle sue difficili condizioni di vita da non essere in grado di riprodursi quando ne ha l'opportunità (Broom e Johnson, 1993).

Molte specie non riescono a riprodursi nelle scadenti condizioni di alcuni zoo a causa del mancato adattamento a questo ambiente. Negli animali d'allevamento, un ritardo o un fallimento nella riproduzione solitamente sono conseguenza di una dieta inadeguata o sono comunque associati a comportamenti anomali (Lindsay, 1985).

Alcuni animali possono essere disturbati dalla vicinanza d'individui dominanti, o anche essere attaccati da questi, e così potrebbe venire a mancare il normale comportamento estrale che porterà al mancato accoppiamento e quindi ad una riduzione del fitness (Fraser e Broom, 1990; Dwyer e Bornett-Gauci, 2004).

Sebbene lo si noti più frequentemente in animali subordinati o in animali soggetti a frequenti cambi di gruppo sociale, la mancanza del comportamento estrale può essere causata anche da eccessivo rumore, da temperature superiori ai 30°C e da condizioni ambientali estreme (Hurnik, 1987).

Anche nei maschi di animali d'allevamento possono esserci difficoltà nel mostrare corretti comportamenti sessuali in circostanze che creino loro apprensione (Fraser e Broom, 1990).

Altro interessante parametro per misurare il benessere animale è la longevità. La riduzione della sopravvivenza dovuta a condizioni sub-ottimali può verificarsi sia negli animali selvatici sia negli animali domestici.

Il tasso di mortalità è un indicatore grossolano ma inequivocabile di benessere povero. I tassi di morbidità sono anche loro degli indicatori dello stato di benessere del branco, ma sono meno precisi dei tassi di mortalità. Esiste tuttavia un problema etico nel permettere che la riduzione di benessere arrivi ad un punto tale da provocare malattie e morte.

La minore produttività può fornire altre indicazioni sul benessere, ma bisogna fare attenzione nell'usare la performance come un indicatore di benessere in quanto innumerevoli sono i fattori che li influenzano (genetica, alimentazione, ecc.).

Una sostanziale riduzione nel tasso di crescita di un vitello, per esempio, è un indice di benessere povero, ma un buon tasso di crescita non è necessariamente un indice di benessere buono. I giovani mammiferi, infatti, possono continuare a crescere rapidamente anche quando il loro benessere è povero.

---

## INDICATORI FISIOLGICI

Gli indicatori fisiologici di benessere sono identificabili rilevando le variabili neuro-ormonali legate all'attivazione dei sistemi simpatico-medullo-surrenale e ipotalamo-ipofisi-corticosurrenali e all'emissione di peptidi come la  $\beta$ -endorfina (Akil *et al.*, 1984; Grossman, 1988), nonché ad altre reazioni, quali variazioni della frequenza cardiaca e alterazioni metaboliche (Wiepkema e Koolhas, 1993; Moberg, 1985). Le esperienze di vita e le caratteristiche genetiche sono in grado di modificare l'intensità e la durata delle reazioni. L'osservazione, quindi, dei sintomi comportamentali di malessere dovrebbe essere messa in relazione con i risultati degli esami clinici e di laboratorio.

---

## RISPOSTA DEL SISTEMA NERVOSO AUTONOMO

---

### FREQUENZA CARDIACA

---

L'aumento della frequenza cardiaca (tachicardia) si verifica quando il livello d'attività fisica di un animale e quindi il suo metabolismo basale aumentano.

La frequenza cardiaca può anche aumentare prima che si verifichi un'azione oppure può diminuire (bradicardia) come risposta emotiva ad una situazione; nell'uomo può rallentare fino al punto dello svenimento (Guyton, 1991).

In generale, il sistema nervoso simpatico porta ad un aumento della frequenza cardiaca ed il sistema nervoso parasimpatico ad una diminuzione.

Le misurazioni della frequenza cardiaca possono essere una risposta utile a problemi a breve termine, purché la misurazione, di per sé, non causi un eccessivo disturbo.

La bradicardia si ha spesso durante la reazione di orientamento, appena dopo la rilevazione di uno stimolo, ma risposta prevalente nella maggior parte delle specie è la tachicardia.

Sono eccezioni solo quelle specie che hanno risposte di “congelamento” (Broom e Johnson, 2000). Ad esempio, Gabrielsen *et al.*, (1977) hanno registrato la frequenza cardiaca di pernici durante l'incubazione delle uova e hanno rilevato, dopo l'avvicinamento di un predatore, bradicardia.

La bradicardia è stata anche rilevata nei roditori allo stato selvatico durante immobilità e si è verificata quando i ratti in laboratorio hanno adottato la reazione di *freezing* (congelamento).

Bisogna essere cauti e considerare la biologia dell'animale quando si usa il cambiamento della frequenza cardiaca come indicatore di benessere proprio perché ogni specie ha i suoi meccanismi di adattamento alle situazioni. Ciò significa che alcuni si adattano con l'accelerazione cardiaca, mentre altri con bradicardia.

In animali come le pecore, la frequenza cardiaca cambia a secondo del modo in cui vengono trattate dagli uomini (Syme e Elphick, 1982).

Un problema comune negli studi della frequenza cardiaca è che le alterazioni cardiache conseguenti all'attività metabolica non si possono distinguere dai cambiamenti dovuti ad una risposta emotiva.

Misure cardiovascolari, come la pressione ematica, sono anch'esse influenzate da stimoli stressanti, ma sono più indicative di problemi a lungo termine (Broom e Johnson, 2000).



## *FREQUENZA RESPIRATORIA E TEMPERATURA CORPOREA*

---

Altri cambiamenti fisiologici che possono essere influenzati in modo analogo alla frequenza cardiaca sono: la frequenza respiratoria e la temperatura corporea.

L'aumento dell'attività che causa tachicardia di solito influenza entrambe queste variabili, le quali possono essere facilmente misurate senza disturbare l'animale.

La frequenza respiratoria si può valutare osservando un animale fermo da una certa distanza. I cambiamenti del ritmo respiratorio si possono verificare durante un disturbo emotivo, senza avere necessariamente un'attività corporea (Mellor e Murray, 1989).

Come per la frequenza cardiaca, un aumento del ritmo respiratorio può essere una risposta ad una situazione percepita dall'individuo o può semplicemente riflettere una maggiore attività corporea. Nel primo caso è d'interesse molto maggiore come misura del benessere.

Anche la temperatura corporea può essere considerata un indice di stato d'ansia o paura; infatti, essa fluttua durante la giornata e può aumentare dopo eventi disturbanti (Broom e Johnson, 2000).

---

## **RISPOSTA NEUROENDOCRINA O DI "STRESS"**

Nel suo importante lavoro sulla sindrome da adattamento generale, Selye (1936, 1939, 1946) ha osservato dei cambiamenti nelle dimensioni dei tessuti endocrini in seguito all'esposizione ad agenti stressanti.

Le risposte neuroendocrine ed endocrine giocano un ruolo importante nel mantenimento dell'omeostasi (Weissman, 1990; Wenk, 1998). In particolare, tendono ad inibire le funzioni non essenziali, quali la crescita (Stratakis e Chrousos, 1995) e la riproduzione (Moberg, 1991; Rivier e Rivest, 1991; Rivest e Rivier, 1995), in favore del mantenimento e della sopravvivenza.

L'effetto complessivo sulla risposta d'adattamento dell'animale allo stress è un'integrazione di risposte ormonali multiple, spesso interattive, che influiscono direttamente sulla salute fisica e sul benessere.

L'evidenza sostanziale suggerisce che le risposte neuroendocrine allo stress possono essere specifiche e graduate, piuttosto che "tutto o niente".

Le risposte a stress acuti hanno importanti funzioni di adattamento e sono vitali per affrontare gli agenti stressanti e per la sopravvivenza; fattori stressanti cronici a lungo

termine suscitano, invece, risposte endocrine che possono contribuire alla morbilità e la mortalità (Matteri *et al.*, 2000).

Dal momento che le indicazioni date dagli ormoni hanno un ruolo vitale nella manutenzione dell'omeostasi, virtualmente ogni sistema endocrino risponde in qualche maniera ad uno specifico agente stressante (Matteri *et al.*, 2000)

Le misurazione dell'attività dell'asse simpatico-medullosurrenalico e del sistema ipotalamo-ipofisi-surrene, con la liberazione in circolo di una molteplicità di ormoni (CRH, ACTH, glucocorticoidi, catecolamine, prolattina ecc.) (Matteri *et al.*, 2000; Moberg, 2000) sono fra le più utili per valutare quanto sia difficile per gli animali affrontare problemi a breve termine. L'attivazione di questi due sistemi consente all'animale di mobilitare la propria energia per far fronte, con il proprio comportamento, all'evento percepito come un'aggressione. Numerosi fattori stressanti possono attivare tali assi, tra cui fattori stressanti psicogeni come: esposizione ad ambienti nuovi o minacciosi, la separazione da oggetti d'attaccamento od eventi esterni non previsti

Esiste una notevole variazione individuale in relazione a come questi ed altri metodi d'adattamento vengono utilizzati.

#### *ASSE IPOTALAMICO-PITUITARIO-SURRENALE E SIMPATICO-MEDULLO-SURRENALICO*

---

Sia il sistema adrenergico-midollare-simpatico sia il sistema ipotalamo-ipofisi-surrene portano a cambiamenti dell'organismo che alterano la gamma di substrati disponibili per un'azione di emergenza: più glucosio dopo l'attività degli ormoni adreno-midollari, più aminoacidi e acidi grassi in seguito a liberazione di cortisolo. L'effetto è di rendere disponibile l'energia per azioni di emergenza.

C'è diversità di decorso temporale, in quanto gli ormoni del midollo surrenale hanno vita più breve rispetto agli ormoni della corteccia surrenale e l'attività della corteccia surrenale ha effetti più a lungo termine.

Entrambi i sistemi possono essere attivati sia in circostanze vantaggiose, sia svantaggiose, quindi bisogna fare attenzione a considerare il contesto della loro attivazione prima di dedurre che si sia verificato un effetto negativo sul benessere (Broom e Johnson, 2000).

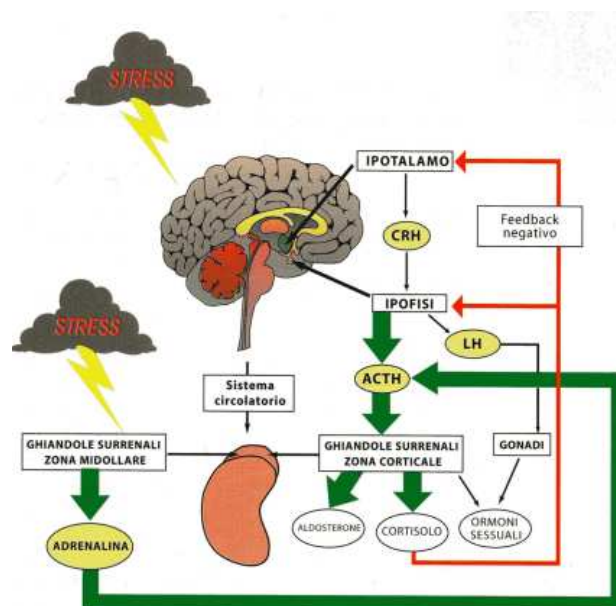


Figura 2: Effetti dello stress.

I prodotti principali della risposta della midollare della surrenale a situazioni d'emergenza sono le catecolamine quali adrenalina e noradrenalina.

La liberazione di queste catecolamine dalla midollare della surrenale si ha nel giro di uno o due secondi dalla percezione dello stimolo, ma il loro metabolismo è molto rapido.

La quantità di adrenalina o noradrenalina liberata nel flusso sanguigno quando si incontrano situazioni ambientali che causano problemi è collegata all'entità del problema, quindi il campione di sangue deve essere preso molto rapidamente se si vogliono ottenere informazioni utili.

I campioni prelevati dopo l'uccisione non possono essere utilizzati, dato che Popper *et al.*, (1977) hanno dimostrato un aumento di 10 volte dell'adrenalina e di 80 volte della noradrenalina nel plasma.

I livelli di adrenalina e noradrenalina nelle urine possono dare qualche informazione, ma sono molto variabili. Anche le interazioni sociali portano ad un aumento della concentrazione di catecolamine plasmatiche.

L'uso dell'adrenalina e della noradrenalina plasmatiche come misura del benessere e in condizioni che durano per un breve periodo di tempo è utile, ma dovrebbe essere limitata agli animali cateterizzati da cui è possibile prelevare campioni nel giro di un minuto dal trattamento (Broom e Johnson, 2000).

La prima fase di attività del sistema ipotalamo-ipofisi-surrene è la secrezione del fattore liberante la corticotropina, CRF o CRH, stimolata dall'interleuchina 1-beta.

La liberazione di ormone adrenocorticotropo (ACTH) dall'adenipofisi, parte anteriore dell'ipofisi, è avviata principalmente dal CRF ma si può verificare anche come reazione alle catecolamine (Axelrod, 1984) all'arginina od agli ormoni neuroipofisari, vasopressina e ossitocina (Gibbs, 1986; Gaillard e Al- Damluji, 1987).

L'ACTH è prodotto da una molecola più grande conosciuta come pro-opiomelanocortina (POMC), che è anche un precursore della  $\beta$ -endorfina, della lipotropina e della melanotropina (Matteri, 1994).

L'ACTH stimola la sintesi ed il rilascio di steroidi da parte della corteccia surrenale, stimolando l'assorbimento di colesterolo e la sua trasformazione enzimatica in cortisolo e corticosterone (Matteri *et al.*, 2000).

La produzione di ACTH e CRF è inibita dai glicocorticoidi e l'ACTH viene eliminata rapidamente dalla corrente ematica.

Quindi le misurazioni dell'ACTH plasmatico devono essere fatte nel giro di pochi minuti dall'evento di cui si vuole valutare l'effetto sul benessere (Broom e Johnson, 2000).

I livelli di glicocorticoidi aumentano in risposta a molti problemi a breve termine della vita e la loro misurazione dà informazioni utili sul benessere degli animali.

Il cortisolo è il glicocorticoide primario negli esseri umani e nella maggior parte dei mammiferi, mentre nei roditori il glicocorticoide primario è il corticosterone (Matteri *et al.*, 2000).

Mantenere una concentrazione di glicocorticoidi sufficiente, ma non eccessiva è necessario per il mantenimento dell'omeostasi. Infatti, un aumento cronico di glicocorticoidi dà luogo a catabolismo proteico, iperglicemia, soppressione delle difese immunitarie, suscettibilità ad infezioni e depressione.

Un aumento dei livelli di questi ormoni non si verifica con ogni tipo di "stressor" (Terlouw *et al.*, 1997). Come molti altri ormoni, i glucocorticoidi aumentano in conseguenza di alcune attività, come quella sessuale o durante l'allattamento (eventi che non dovrebbero essere dolorosi) e presentano un ritmo circadiano di secrezione, ma tali ritmi possono essere aboliti da condizioni di stress prolungato (Przkop *et al.*, 1985); tale ritmicità e secrezione episodica richiederebbe perciò, per una corretta valutazione della concentrazione plasmatica di cortisolo, frequenti prelievi ematici.

Il dolore prolungato può determinare una diminuzione di cortisolo. Le differenze individuali delle concentrazioni di corticosteroidi sono notevoli. Più che il livello medio sono fisiologicamente importanti le singole emissioni. In qualche caso gli elevati livelli di

corticosteroidi possono migliorare l'immunità  
([www.sinab.it/programmi/webcreate.php?id=749](http://www.sinab.it/programmi/webcreate.php?id=749)).

Poiché la risposta del cortisolo rispecchia i diversi tentativi di adattamento dell'organismo durante il periodo di stress (Dess *et al.*, 1983), i suoi livelli permettono di monitorare lo stato di benessere in maniera molto sensibile. Per contro però, Willemse *et al.* (1993) hanno dimostrato che, agenti stressanti inerenti la pratica veterinaria come la manipolazione e i test cutanei, portano ad una pronunciata risposta da parte dell'asse HPA. Nella maggior parte delle specie il ritardo prima della liberazione dei glicocorticoidi è almeno due minuti, quindi gli effetti di un particolare trattamento possono essere misurati se si preleva un campione di sangue nel giro di due minuti dall'inizio della procedura di campionamento (Broom e Johnson, 2000).

Alcuni animali, come i cani, sembrano meno propensi a rispondere ad agenti stressanti minori come le iniezioni endovenose (Knol *et al.*, 1992), sebbene l'immobilizzazione sia comunque in grado di aumentare la concentrazione plasmatica di glucocorticoidi (Kemppainen e Sartin, 1987; Rothuizen *et al.*, 1993). Altro svantaggio nell'utilizzo del sangue per il dosaggio ormonale è che i campioni non sono sempre disponibili, la quantità di sangue che può essere raccolta, in un determinato tempo, è limitata ed in più esistono vari problemi di sicurezza ed etici (Koren *et al.*, 2002).

Per questo sono privilegiati i metodi di campionamento senza "feedback" ("feedback-free"). Alcuni ricercatori hanno fatto uso di piani speciali di campionamento di sangue (Cook *et al.*, 2000); altri hanno attuato procedure di campionamento non invasive come la determinazione del cortisolo o dei suoi metaboliti nelle urine (Hay *et al.*, 2000), nelle feci (Beerda *et al.*, 1996), nella saliva (Cooper *et al.*, 1989) o nel latte (Verkerk *et al.*, 1998). Nonostante ciò, sono stati evidenziati dei problemi: la raccolta di saliva o di urine necessita di qualche manipolazione dell'animale ed il latte è limitato ad animali in lattazione. Solo campioni fecali offrono il vantaggio di poter essere raccolti senza stressare gli animali, ma le concentrazioni ormonali possono essere modificate dal regime alimentare.

Schatz e Palme (2001) effettuarono uno studio per ottenere informazioni riguardanti il metabolismo e l'escrezione dei glucocorticoidi, al fine di utilizzare i metaboliti del cortisolo nelle feci per un approccio non invasivo nel monitoraggio dello stress.

Essi somministrarono cortisolo radioattivo in vena ad otto animali e per sei giorni raccolsero le feci e le urine subito dopo defecazione e urinazione spontanea per valutare il

tempo di comparsa dei metaboliti nelle urine e nelle feci, l'ammontare di tali metaboliti e per caratterizzarli. Furono così rilevate differenze di specie: mentre i gatti escretarono cortisolo soprattutto nelle feci ( $82\% \pm 4\%$  della totale radioattività), i cani, invece, ne eliminarono per questa via solo una piccola quantità ( $23\% \pm 4\%$ ). La più alta radioattività urinaria fu osservata dopo  $9 \pm 3$  ore nel gatto e dopo  $3 \pm 1$  ore nel cane. Le concentrazioni picco nelle feci si verificarono dopo  $22 \pm 6$  ore nel gatto e dopo  $24 \pm 4$  ore nel cane. Inoltre, riscontrarono che i metaboliti escreti nelle urine e nelle feci sono soprattutto molecole coniugate o polari non coniugate. I campioni di urine e di feci sono, però, talvolta, difficili da ottenere da animali “*free-ranging*”, che non possono essere continuamente osservati, o da specie che le depositano in latrine comuni (Mostl e Palme, 2002).

Il cortisolo misurato nelle urine può essere confrontato ai livelli di creatinina che è escreta ad una velocità relativamente costante (Novak e Drewsan, 1989).

La misurazione della concentrazione urinaria di cortisolo è stata utilizzata principalmente per caratterizzare disordini dell'asse pituitario-adrenocorticale nei cani (Rijnberk e mol, 1989; Kaplan *et al.*, 1995) e nei gatti (Goosens *et al.*, 1995).

La misurazione dei livelli di cortisolo può essere effettuata anche in campioni di saliva (Beerda *et al.*, 1996; Kobelt *et al.*, 2003). La quantità di cortisolo nella saliva è minore di quella che si trova nel plasma, è quindi necessario un dosaggio più sensibile.

I glicocorticoidi plasmatici esistono in forma libera e legati a proteine. Nella saliva è presente solo la forma libera, ma questa probabilmente è la più pertinente quando vogliamo valutare le risposte a difficoltà ambientali. Questa tecnica comporta comunque una certa manipolazione dei soggetti con possibili interferenze sui risultati (Schatz e Palme, 2001); in più, la saliva, come il sangue, deve essere subito refrigerata o congelata e ciò è spesso difficile da attuare soprattutto in campo.

I livelli di cortisolo nella saliva aumentano in risposta a iniezioni di ACTH in alcuni animali (Fell *et al.*, 1985) e non sono influenzate dalla velocità del flusso di saliva (Fell e Shutt, 1986).

Un dosaggio ormonale “alternativo” (Koren *et al.*, 2002) è stato realizzato dal pelo, che può essere raccolto non invasivamente. Il campionamento del pelo presenta infatti il vantaggio di essere prontamente disponibile, di facile raccolta, trasporto e stoccaggio, non comporta dolore o possibile infezione e il risultato non è affetto dallo “stress momentaneo” dovuto al contenimento dell'animale. Inoltre, il dosaggio ormonale

sul pelo, pur non consentendo di esaminare variazioni della secrezione a breve termine (orarie o quotidiane), può permettere di monitorare i cambiamenti ormonali che si realizzano in settimane o mesi (Maurel *et al.*, 1986), rasando il pelo e ricampionando la ricrescita, il che può essere considerato vantaggioso qualora si vogliano evidenziare gli effetti di elevate concentrazioni ematiche di cortisolo per periodi prolungati (stress cronico). Peraltro il pelo è già stato utilizzato per fini non convenzionali o per monitoraggi endocrini come per estrarre DNA (Woodruff, 1993; Morin *et al.*, 1994), per fare diagnosi precoce di gravidanza nelle vacche tramite il progesterone (Liu *et al.*, 1988), per testare l'estradiolo ed il testosterone nei bovini (Gleixner e Meyer, 1997) e l'abuso di steroidi anabolizzanti e corticosteroidi negli atleti (Bowers e Segura, 1996; Hold *et al.*, 1999; Kintz *et al.*, 1999; Cirimele *et al.*, 2000). Nell'uomo, i livelli di ormoni steroidi nel pelo non variano significativamente tra le diverse regioni dello scalpo, in più i livelli di estradiolo, progesterone e testosterone misurati nel pelo si correlano significativamente con i livelli misurati nel siero (Yang *et al.*, 1998). Il pelo, invece, non è mai stato utilizzato per il dosaggio di ormoni steroidei nel cane e nel gatto.

Risulta quindi evidente che ognuno dei metodi di campionamento sopraccitato presenta dei vantaggi e degli svantaggi.

### ASSE SOMATOTROFICO

---

E' stato accertato che anche l'asse somatotrofico entra a far parte di quei sistemi che si attivano in risposta allo stress.

L'asse somatotrofico entra nei meccanismi neurali ed endocrini che controllano la produzione e secrezione dell'ormone della crescita (GH) e le conseguenti risposte fisiologiche all'ormone secreto. Cellule specializzate della ghiandola pituitaria anteriore, chiamate somatotropine, producono e rilasciano (GH).

L'ormone che rilascia l'ormone della crescita (GHRH) e la somatostatina sono importanti fattori ipotalamici che esercitano rispettivamente effetti di stimolazione ed inibizione sulla secrezione di GH (Matteri *et al.*, 2000).

Uno degli effetti di GH è la stimolazione del fegato affinché questo produca e rilasci *Insulin-like Growth Factor* (IGF-I). La crescita e lo sviluppo di alcuni tessuti periferici è dipendente da IGF-I (Holly e Wass, 1989).

L'asse somatotrofico risponde allo stress aumentando contemporaneamente la secrezione di GH e diminuendo quella di IGF-I (Vance *et al.*, 1992; Kakizawa *et al.*, 1995; Bruggeman *et al.*, 1997; Carroll *et al.*, 1998; McCusker, 1998).

Queste risposte endocrine agiscono per deviare energia dalla crescita alla sopravvivenza.

Si pensa che una riduzione in IGF-I limiti la crescita nei periodi di angoscia, preservando ulteriormente energia per scopi di sopravvivenza; è interessante notare che le esperienze emotive positive possono essere associate con la diminuzione della secrezione di GH (Berk *et al.*, 1989).

E' stato rilevato da numerosi Autori che, nelle diverse specie, è possibile avere un aumento o una diminuzione del GH a seconda delle situazioni stressanti a cui è sottoposto l'animale; ad esempio, nei ratti, l'affollamento di molti individui riduce la secrezione di GH (Armario *et al.*, 1987); lo stress psicologico acuto, invece, aumenta in modo transitorio la secrezione di GH in altre specie (Rushen *et al.*, 1993; Cataldi *et al.*, 1994; Gerra *et al.*, 1998); negli esseri umani, diversi stress psicologici elevano la secrezione di GH (Gerra *et al.*, 1998).

Il forte aumento nella secrezione di GH a seguito dello stress sembra essere mediato da un aumento di rilascio di GHRH (Cataldi *et al.*, 1994); le concentrazioni di IGF-I sono invece ridotte rapidamente a seguito dell'applicazione dell'agente stressante (Farmer *et al.*, 1991).

Gli effetti da stress nutritivo (sottoalimentazione, digiuno) sull'asse somatotrofico, riducono la secrezione di GH ed IGF-I nei roditori (Vance *et al.*, 1992; Straus, 1994). In altre specie la sottoalimentazione induce un concomitante incremento nella secrezione di GH e soppressione dell'IGF I circolante (Straus, 1994). La scarsa nutrizione riduce i recettori di GH a livello del fegato e/o la trasmissione dei segnali al recettore di GH (Straus, 1994; Villares *et al.*, 1994; Ketelslegers *et al.*, 1995), contribuendo così alla soppressione o alla secrezione di IGF-I in concomitanza con livelli alti di GH.

Il concomitante aumento di secrezione di GH e soppressione della secrezione di IGF è un'importante risposta di adattamento che devia un substrato di energia dalla crescita alla sopravvivenza.

Anche gli stress termici possono determinare una modificazione della produzione di GH con un aumento di questo, quando l'animale è esposto a temperature elevate o una diminuzione, se la temperatura è calata drasticamente (Weeke e Gunderson, 1983).



L'esposizione a basse temperature riduce anche la secrezione di IGF-I (Ozawa *et al.*, 1994).

La riduzione della secrezione di IGF può essere una risposta di adattamento ad un ambiente che richiede un aumento di consumo di energia per mantenere la temperatura del corpo piuttosto che la crescita. Analogamente, un aumento della temperatura, favorisce la secrezione di IGF (Ma *et al.*, 1992).

### ASSE GONADOTROFICO

---

Oltre agli ormoni visti, esistono anche ormoni riproduttivi, che vengono influenzati dall'esposizione a condizioni difficili. Non è conosciuto nel dettaglio come i cambiamenti di queste concentrazioni ormonali aiutino gli animali ad affrontare la situazione, né come potrebbero indicare la probabilità di non riuscire ad affrontare la situazione (Broom e Johnson, 2000).

I livelli dell'ormone luteinico LH nel plasma sono maggiori dopo una varietà di trattamenti come la manipolazione, l'esposizione ad un ambiente nuovo o ad un rumore, ma la risposta dipende dalla fase del ciclo estrale (Turpen *et al.*, 1976).

L'FSH e il testosterone sono di poca utilità come indicatori del benessere, perché possono aumentare, rimanere invariati o diminuire in situazioni che sono definibili come difficili per gli animali.

Lo stress psicologico e termico acuto possono suscitare un aumento della secrezione di LH, ma non di FSH (Siegel *et al.*, 1981; Sakamoto *et al.*, 1991).

Lo stress cronico, invece, è riconosciuto come causa della diminuzione della secrezione di gonadotropine e del fallimento riproduttivo (Moberg, 1991; Rivier e Rivest, 1991).

Come osservò Selye (1939), in casi di emergenza, sembra che il sistema ipotalamo-pituitario tenda a produrre più ormone adrenocorticotropo e meno ormone gonadotropo, rispetto al normale.

La causa di questo probabilmente è che, in certe condizioni, un sostentamento della corteccia surrenale per il mantenimento della vita è una necessità più impellente che la conservazione della normale funzione sessuale (Selye, 1939).

### ASSE TIROTROFICO

---

Rispetto ad altri ormoni pituitari anteriori, si conosce meno riguardo agli effetti dello stress psicologico acuto sulla secrezione di TSH fra le varie specie. Ad esempio, mentre uno stress a breve termine produce un aumento transitorio della secrezione di TSH negli esseri umani (Richter *et al.*, 1996), un calo in secrezione è osservato nei roditori (Goya *et al.*, 1995; Marti *et al.*, 1996).

Molte ore di stress da freddo aumentano i livelli di TSH e di ormoni tiroidei nei roditori (Goya *et al.*, 1995), ma non negli umani (Leppaluoto *et al.*, 1988).

Forse le minori dimensioni danno luogo a più rapidi cambiamenti della temperatura centrale, durante lo stress da freddo che causa l'attivazione dell'asse tiroideo.

### PROLATTINA

---

Un altro ormone che va preso in considerazione quando si parla di stress è la prolattina (PRL), infatti nello stress psicologico acuto aumenta la secrezione di PRL in molte specie (Klemcke *et al.*, 1987; Jurcovicova *et al.*, 1990; Kirschbaum *et al.*, 1993; Matthews e Parrott, 1994; Juszczak, 1998).

L'entità della risposta della prolattina dipende dai livelli di base, che dipendono a loro volta dal sesso dell'individuo e nelle femmine dalla fase del ciclo dell'estro. Durante la fase che precede l'estro i livelli di base di prolattina sono alti, ma durante il diestro sono bassi, quindi è possibile un aumento della risposta alle condizioni di difficoltà (Riegle e Meites, 1976; Turpen *et al.*, 1976).

I fattori comportamentali possono influenzare la secrezione di PRL in risposta allo stress. Risposte allo stress passive, piuttosto che attive sono associate ad un aumento della secrezione di PRL (Theorell, 1998). Tendenze aggressive come lottare con i propri pari, comportamenti di opposizione, sembrano essere riferite ad un livello più alto di secrezione di PRL basale (Gerra *et al.*, 1998).

Si pensa che la regolazione primaria della secrezione pituitaria di prolattina sia mediata dagli effetti soppressivi della dopamina ipotalamica che raggiunge la ghiandola pituitaria attraverso il sistema portale ed ipofisario.

Mentre la maggior parte delle risposte della PRL allo stress sono caratterizzate da aumenti della secrezione di ormoni, livelli di PRL ridotti possono verificarsi come conseguenza di stress cronico, come quelli incontrati durante una malattia prolungata (Van den Berghe e de Zegher, 1996).

Disturbi di piccola entità, per esempio cinque minuti di manipolazione, il prelievo del sangue o iniezioni intraperitoneali di soluzione fisiologica o movimenti della gabbia, possono suscitare aumenti della prolattina plasmatica, che, quindi può essere considerata una misura sensibile del benessere (Krulich *et al.*, 1974; Seggie e Brown, 1975; Gartner *et al.*, 1980).

### ALTRI ORMONI

---

I glicocorticoidi sono ovviamente gli ormoni più interessati per lo studio degli adattamenti metabolici alle condizioni di difficoltà, ma ci sono anche altri ormoni che possono riflettere le modifiche dell'ambiente.

Il glucagone è coinvolto nella regolazione dei livelli plasmatici di glucosio, ma è stato misurato solamente in alcuni studi sulla risposta a condizioni difficili (Broom e Johnson, 2000). Aumenti transitori si verificavano, ad esempio, dopo la chirurgia dei tendini nei cavalli (Silver, 1982) e, anche nell'uomo, sono stati riportati degli aumenti in relazione alla portata del trauma chirurgico (Anand *et al.*, 1987; Anand *et al.*, 1988).

La risposta ad eventi minacciosi e allarmanti nell'ambiente coinvolge i sistemi dopaminergico e noradrenergico nel cervello (Smelik, 1987). Dopo situazioni di questo tipo, la dopamina e la noradrenalina possono scomparire in alcune parti del cervello, oppure ci può essere un aumento dei metaboliti di questi neurotrasmettitori. In un periodo di tempo più lungo, si possono evidenziare livelli maggiori, derivati da una sintesi superiore al normale. Le concentrazioni di dopamina nel cervello di animali sottoposti a condizioni difficili variano secondo la natura dello stimolo, quindi il valore di queste misurazioni è dubbio.

La serotonina media un sistema inibitorio comportamentale che reprime i comportamenti motivati dall'emergenza, svolgendo un ruolo nella capacità di monitorare l'ambiente in modo flessibile e di rispondere con comportamenti appropriati alla situazione. La disfunzione nella secrezione della serotonina, indotta da stress, danneggia il funzionamento di questo sistema inibitorio comportamentale favorendo fenomeni come l'impulsività, l'eccessiva risposta d'allarme, una reattività emotiva esagerata a stimoli relativamente lievi, le esplosioni di aggressività, la ritualizzazione compulsiva degli schemi comportamentali collegati a un trauma e un'incapacità di imparare dagli errori passati.

Le  $\beta$ -endorfine appartengono ad un gruppo di peptidi denominati oppioidi endogeni in quanto, a livello centrale, esercitano un'azione morfino-simile; vengono liberate per il loro effetto analgesico durante situazioni di fatica e/o di dolore e, forse, partecipano al programma di adattamento metabolico successivo all'applicazione dello stressor.

---

## VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ENZIMATICA

La misurazione della maggior parte dell'attività enzimatica è più appropriata ad una valutazione del benessere a lungo termine, piuttosto che a breve, poiché ci vuole del tempo per produrre un'ulteriore quantità di enzima dopo un cambiamento dell'ambiente (Broom e Johnson, 2000).

Tuttavia, alcuni livelli enzimatici cambiano abbastanza rapidamente da fornire anche un indicatore utile per i problemi a breve termine.

La renina viene prodotta nel rene ed è coinvolta nella regolazione del bilancio idrico e della pressione ematica. I suoi livelli nel plasma sono correlati all'attività del sistema nervoso simpatico (Broom e Johnson, 2000).

Nel plasma si trovano diverse proteine a concentrazioni molto superiori dopo lesioni tessutali ed alcune sono liberate nel flusso ematico al momento dell'esperienza spiacevole, anche se quest'ultima non causa una lesione tissutale (Adams e Rinnie, 1982).

Un altro enzima che passa dal muscolo al flusso sanguigno in determinate situazioni, è una forma di lattato deidrogenasi (LDH).

Esistono cinque enzimi dell'LDH: l'LDH5, che si trova soprattutto nel muscolo striato e nel fegato, aumenta nel plasma dopo un danno muscolare o esposizione a condizioni disturbanti. L'aumento dell'enzima richiede molti minuti e i livelli rimangono elevati per alcune ore, quindi potrebbe essere un indicatore del benessere più utile rispetto ai cambiamenti ormonali che risultano essere più transitori (Broom e Johnson, 2000).

Nel complesso, la misurazione del glucosio plasmatico, invece, è di poco aiuto come indicatore del benessere, a meno che non siano disponibili diversi campioni di plasma, e l'ottenimento di questi campioni potrebbe causare ulteriori cambiamenti dell'attività surrenale e della produzione di glucosio (Broom e Johnson, 2000).

---

## PARAMETRI EMATICI

Alcuni Autori ritengono che i parametri ematici, sia per quanto riguarda l'esame emocromocitometrico e la formula leucocitaria (Archetti e Ravarotto, 2002), che per il profilo metabolico (Bertolin *et al.*, 2002), possano essere impiegati come validi indicatori di alterazioni a livello fisiologico direttamente collegate ad una condizione di stress dell'animale. Inoltre, possono aiutare nell'individuazione del *disease stress*, cioè dello stress collegato ad uno stato patologico: uno stato infiammatorio, infatti, può essere esso stesso causa di minor benessere, accentuando il rischio di malattia nell'animale (Bertoni, 2002).

---

## RISPOSTA DEL SISTEMA IMMUNITARIO

Già da molto tempo ci si è resi conto che la suscettibilità alle malattie aumenta in proporzione con lo stress subito (Kelley, 1985; Stein *et al.*, 1985; Calabrese *et al.*, 1987; Breazile, 1988; Griffin, 1989). Si è quindi potuto postulare che l'insulto stressante agisce sui fattori cellulari ed umorali dell'immunità deprimendoli nel caso dello stress acuto e forse potenziandoli quando la ripetizione dello stress provoca l'adattamento ad esso. Lo stress è in grado di alterare i livelli di anticorpi circolanti, di sopprimere la risposta dei linfociti ai fattori mitogeni ed antigenici e di stimolare subpopolazioni di linfociti aberranti.

L'utilizzo dei parametri immunitari per la valutazione del benessere presenta alcuni vantaggi:

- non risentono in linea generale delle turbative legate alle manualità di prelievo dei campioni biologici, al contrario delle risposte ormonali;
- si basano su parametri obiettivabili e non su giudizi soggettivi, come i parametri comportamentali;
- non richiedono tempi prolungati di osservazione come i parametri comportamentali;
- non richiedono l'impiego prolungato di personale specializzato;
- forniscono dati predittivi sulla possibile evoluzione di condizioni di scarso benessere verso patologie clinicamente conclamate.

Secondo Janeway (1989) la risposta immunitaria a carattere immediato (< 4 ore) e precoce (4 – 96 ore) è mediata dal sistema immunitario innato, non adattativo, che condiziona in forma primaria l'interazione con i più comuni patogeni ambientali. Lo

stress è in grado di deprimere tali risposte di fase immediata e precoce, costringendo l'individuo a ricorrere massicciamente a risposte più tardive (>96 ore) di tipo adattativo, specifiche (anticorpi e linfociti T citotossici), nell'ambito di quadri anatomico-clinici indubbiamente più gravi. In pratica, da un disturbo emotivo si passa ad uno squilibrio neuroendocrino, cui possono conseguire alterazioni fisio-patologiche (Broom e Johnson, 1993). Tra queste, vi è anche una riduzione della attività immunitaria umorale e cellulo-mediata, alla quale è possibile ricondurre una aumentata sensibilità ad agenti di malattie infettive.

Un modo ovvio per scoprire gli effetti che hanno le condizioni di difficoltà sulla capacità di un animale di combattere la malattia è contare i leucociti in campioni di sangue o altri liquidi corporei. Il cambiamento del numero totale di leucociti, tuttavia, si verifica in diverse circostanze soprattutto quando c'è un'aggressione da parte di un microrganismo patogeno.

Un perfezionamento del conteggio dei leucociti totali è il calcolo del rapporto fra un tipo di leucocita e un altro (Broom e Johnson, 2000).

Per ciò che riguarda lo studio degli anticorpi presenti durante lo stress, possiamo dire che compaiono immunoglobuline di 4 tipi, conosciute come IgA, IgE, IgG e IgM.

Questi anticorpi vengono prodotti dai linfociti B. Le quantità totali di immunoglobuline si possono misurare nel plasma o nel colostro e le IgA si possono misurare nella saliva.

La produzione di anticorpi è influenzata dalle linfocine prodotte da una delle forme di linfocita T, la cellula T-helper; quindi la misurazione della riduzione dei titoli anticorpali è un modo indiretto di accertare la difficoltà che ha un animale nell'affrontare il proprio ambiente.

I linfociti T possono agire direttamente sugli antigeni estranei e la loro azione è influenzata dal successo dell'animale ad affrontare la situazione, quindi la misurazione dell'attività T linfocitaria può essere un indicatore utile del grado di benessere dell'animale (Broom e Johnson, 2000).

Tuttavia, l'interpretazione di queste misurazioni richiede attenzione, dato che la proliferazione e l'attività dei linfociti T possono essere indotti da vari fattori, soprattutto la presenza di microrganismi patogeni (Broom e Johnson, 2000).

# PARTE SPERIMENTALE

# OBIETTIVI DELLA RICERCA

La definizione di “benessere animale” e le modalità di determinazione di tale parametro sono ancora ampiamente dibattute. C’è, però, una generale concordanza sul fatto che una condizione di malessere dia origine a variazioni fisiologiche e comportamentali che possono essere rilevate e misurate. Tra i parametri endocrini, il più studiato è, senza dubbio, il cortisolo, in quanto connesso con l’attivazione dell’asse ipotalamico-pituitario-surrenale in condizioni di stress e quindi ritenuto indicatore ideale di benessere, benché debba essere utilizzato con cautela in quanto un aumento dei livelli di questo ormone non si verifica con ogni tipo di *stressor*. Inoltre, si deve considerare che la raccolta del campione per effettuare le analisi, spesso implica il confinamento ed il contenimento degli animali e può essere, quindi, essa stessa un fattore stressante andando ad alterare i risultati.

Alla luce delle suddette conoscenze gli obiettivi scientifici di questa ricerca, sono stati innanzitutto validare il metodo di dosaggio di cortisolo dal pelo nel gatto e nel cane e stabilire se tale dosaggio può rappresentare un indicatore, non invasivo, di benessere dell’animale (indice di “stress cronico”). In seguito, abbiamo voluto individuare i fattori di stress psico-sociale in gatti che vivono in gattile, in condizioni di alta densità, analizzando i correlati comportamentali ed ormonali dello stress e del benessere in questa condizione socio-ecologica, ricercando, in particolare, l’evidenza ormonale di uno stato di stress prolungato e la messa in atto di strategie comportamentali di contenimento dello stesso e il ruolo della marcatura visivo-feromonale, inoltre abbiamo effettuato un confronto tra oasi feline di diversa estensione spaziale per valutare come varia lo stress in rapporto allo spazio disponibile.

Invece, nel cane abbiamo voluto evidenziare eventuali differenze dei livelli ormonali tra cani di proprietà e cani di canili, tra cani ospitati in diversi canili e tra cani che vivono in diverse realtà familiari; abbiamo valutato gli effetti di alcuni arricchimenti sui cani di canile ed, infine, abbiamo analizzato cani sottoposti a specifici programmi di addestramento.



# LA DETERMINAZIONE DEL CORTISOLO NEL PELO E NELLE FECI DI GATTI E CANI

## SCOPI

Negli ultimi decenni l'aumento dell'attenzione sul benessere animale ha stimolato ricerche sugli effetti degli ambienti di ricovero promuovendo studi con lo scopo di validare tecniche alternative non invasive per monitorare la funzione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA). La decisione di utilizzare tecniche non invasive per controllare l'attività dell'HPA negli animali può essere essenziale per ragioni etiche, obbligatoria per ragioni logistiche e basata su considerazioni sperimentali.

Il contenimento e la manipolazione richiesti per la raccolta del campione di sangue possono essere fattori stressanti e causare un aumento della concentrazione di glucocorticoidi periferici in pochi minuti (Beerda *et al.*, 1996; Carlstead *et al.*, 1992, 1993; Willemse *et al.*, 1993).

Attualmente le metodiche applicate includono la misurazione dei corticoidi nelle feci, nell'urina e nella saliva (Cook *et al.*, 2000). Recentemente alcuni autori (Koren *et al.*, 2002; Davenport *et al.*, 2006) hanno riportato un nuovo metodo per determinare i livelli endogeni degli ormoni steroidei nel pelo. Koren *et al.* (2002) hanno mostrato che il rango sociale è associato ai livelli di testosterone, ma non a quelli di cortisolo misurati nel pelo delle procavie. Davenport *et al.* (2006) hanno validato una semplice procedura per misurare la concentrazione di cortisolo nel pelo dei macachi.

L'analisi degli ormoni steroidei del pelo potrebbe essere utile negli studi dello stress cronico e del benessere che richiedono il monitoraggio dell'asse HPA per lunghi periodi.

L'analisi del pelo è stata già utilizzata per vari scopi: per individuare inquinanti, droghe, steroidi anabolizzanti e altri componenti e per determinare gli steroidi sessuali e i glucocorticoidi (Koren *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 1998).

Il pelo è abbastanza facile da campionare, la sua raccolta non comporta dolore o possibili infezioni, è facile da conservare e non è affetto dalle variazioni del contenuto d'acqua. La caratteristica principale che rende l'analisi del pelo particolarmente interessante è che esso offre un profilo endocrino a lungo termine cioè una misura media dell'attività ormonale nel periodo prescelto. Questa misurazione è insensibile allo stress acuto compreso quello causato dalla manipolazione durante le procedure di campionamento. E' sufficiente rasare e ricampionare il pelo per determinare il *background* endocrino di un *trend* comportamentale, ma anche il pelo caduto può dare indicazioni preziose sul profilo ormonale degli individui. Al contrario, a causa della sua lenta crescita, il pelo non fornisce indicazioni su brevi periodi di tempo poiché non riflette le fluttuazioni orarie o giornaliere degli ormoni circolanti (Koren *et al.*, 2002). Il limite principale di questo metodo è l'incompleta informazione sulla fisiologia del pelo e l'assenza di validazioni.

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di verificare se questo metodo è applicabile ai cani e ai gatti domestici. A questo scopo sono stati raccolti campioni di feci di cane e gatto *ad libitum* per l'intero periodo di studio per compararne i livelli di cortisolo con quelli determinati nel pelo di ricrescita.

## MATERIALI E METODI

### SOGGETTI DELLO STUDIO

**Gatti:** sono stati utilizzati 27 gatti, 19 femmine e 8 maschi di età compresa tra 2 e 10 anni, scelti casualmente all'interno di un gattile. Tutti i gatti vivevano in gruppo ed erano tenuti nelle stesse condizioni. Il gattile comprendeva un locale chiuso ed un giardino.

**Cani:** sono stati utilizzati 29 cani, 8 femmine e 21 maschi, di età compresa tra 1 e 7 anni, scelti in due contesti: un canile e un corso per cani da "utilità e difesa". I cani del canile (5 femmine e 9 maschi) erano per lo più meticci e solo le femmine erano sterilizzate. I cani da utilità e difesa (3 femmine e 12 maschi) erano interi e di razza Pastore tedesco.

## RACCOLTA E TRATTAMENTO DEL MATERIALE BIOLOGICO

**Gatti:** il pelo è stato raccolto dalla regione ischiatica mediante rasatura effettuata con forbici a livello della pelle 1-2 giorni prima dell'inizio dello studio per eliminare il pelo vecchio. La stessa area anatomica è stata rasata nuovamente alla fine del periodo di studio per raccogliere il pelo ricresciuto. Il materiale così raccolto è stato subito posto in buste di plastica a chiusura ermetica, identificato per mezzo di un'etichetta (riportante: nome del soggetto, data, regione anatomica di prelievo) e successivamente conservato a temperatura ambiente fino al momento delle analisi.



**Figura 3:** Soggetto dopo prelievo di un campione di pelo (a sx) e pelo posto all'interno di una busta di plastica (dx).

Le feci sono state raccolte al momento dell'emissione tra le 7:00 e le 21:00, prestando attenzione a che non venissero contaminate da altri escrementi presenti nel luogo in cui l'animale espletava il bisogno. Sono state quindi collocate in apposite buste di plastica, identificate per mezzo di un'etichetta recante data e ora di emissione e soggetto di appartenenza e successivamente conservate ad una temperatura di -20°C.

Ogni gatto ha fornito un campione di pelo ( $n=27$ ) cresciuto durante il periodo di campionamento delle feci. Il numero di campioni di feci e la durata del campionamento variava da gatto a gatto. In tutto, i 27 gatti hanno contribuito con una media di  $5,89 \pm 0,72$  (media  $\pm$  E.S.) campioni di feci in un periodo medio di  $94,96 \pm 9,36$  giorni (22 gatti hanno fornito  $5,36 \pm 0,67$  feci in  $73,45 \pm 1,73$  giorni mentre 5 individui hanno fornito  $8,20 \pm 2,50$  feci in 194 giorni). Le differenze della durata del periodo di campionamento sono state causate dalle adozioni o dal trasferimento di alcuni gatti.

**Cani:** i campioni di pelo sono stati raccolti e trattati come quelli dei gatti. I campioni di feci sono stati raccolti approssimativamente ogni 3 giorni e poi trattati come

descritto per i gatti. Ogni cane di canile ha fornito un campione di pelo di ricrescita ( $n=14$ ) e una media di  $14,5 \pm 0,91$  campioni di feci nell'arco di tempo di 78 giorni. I cani da utilità e difesa hanno fornito un campione di pelo di ricrescita ( $n=15$ ) e  $33,86 \pm 4,86$  campioni di feci in un periodo di  $87,93 \pm 2,15$  giorni.



**Figura 4:** Campione di pelo di cane (sx) e stesso campione dopo il taglio in frammenti di 1 – 3 mm di lunghezza (dx).

## DETERMINAZIONE DEL CORTISOLO

Un totale di 56 campioni di pelo (27 di gatto e 29 di cane) e 870 di feci (159 di gatto e 711 di cane) sono stati analizzati. La concentrazione di cortisolo è stata determinata per mezzo di analisi radioimmunologiche (RIA). Le concentrazioni di cortisolo sono state espresse in pg/mg di peli o feci.

### ESTRAZIONE DAL PELO

L'estrazione del cortisolo dai campioni di pelo è stata effettuata secondo la metodica descritta da Koren *et al.* (2002) e da noi parzialmente modificata: a 60 mg di pelo, tagliato in frammenti di 1-3 mm di lunghezza, sono stati aggiunti 5 ml di metanolo. Il tutto è stato incubato a  $+50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , in leggera agitazione, per 18 ore. Successivamente i campioni sono stati filtrati, per separare il pelo dalla componente liquida, ed il metanolo è stato fatto evaporare sotto cappa di aspirazione a flusso di aria, a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Il residuo secco è stato poi disciolto in 0,6 ml di tampone fosfato 0,05 M pH 7,5.

E' stato eseguito un test di recupero su 5 replicati aggiungendo 125, 250, 500 o 1000 pg di  $^3\text{H}$ -cortisolo a 60 mg di pelo tagliato e incubando per 18 ore a temperatura

ambiente. L'estrazione è stata effettuata come descritto sopra. La percentuale media di recupero è stata di  $90,61 \pm 2,48$ .

---

## ESTRAZIONE DALLE FECI

L'estrazione del cortisolo dai campioni di feci è stata effettuata secondo la metodica descritta da Schatz e Palme (2001) e da noi modificata: a 500 mg di feci sono stati aggiunti 5 ml di una soluzione metanolo:acqua (v/v 4:1). I campioni sono stati posti in agitazione per 30 minuti su multivortex e successivamente centrifugati a 1500 g per 15 minuti. Dai suddetti campioni è stato prelevato 1 ml di supernatante al quale sono stati aggiunti 5 ml di etere etilico e 0,2 ml di  $\text{NaHCO}_3$  (5%). I campioni sono stati poi agitati su multivortex per 1 minuto e centrifugati a 1500 g per 5 minuti. La porzione eterea è stata poi separata e fatta evaporare sotto cappa di aspirazione a flusso di aria a 37°C. Il residuo secco è stato poi disciolto in 0,5 ml di tampone fosfato 0,05 M pH 7,5.

E' stato eseguito un test di recupero su 5 replicati aggiungendo 125, 250, 500 o 1000 pg di  $^3\text{H}$ -cortisolo a 500 mg di feci e incubando per 30 minuti a temperatura ambiente. L'estrazione è stata effettuata come descritto sopra. La percentuale media di recupero è stata di  $89,74 \pm 2,64$ .

---

## DOSAGGIO DEL CORTISOLO

La determinazione del cortisolo nel pelo e nelle feci è stata effettuata come descritto da Tamanini *et al.* (1983).

L'analisi è stata effettuata in duplicato: a 100  $\mu\text{l}$  della soluzione ottenuta dall'estrazione degli ormoni steroidei dal pelo e dalle feci sono stati aggiunti 100  $\mu\text{l}$  di  $^3\text{H}$ -cortisolo (attività specifica: 100 Ci/mmol, quantità: 30 pg/tubo, 12771 dpm/100  $\mu\text{l}$ ) e 100  $\mu\text{l}$  di anticorpo anticortisolo alla diluizione di 1:20000. Dopo incubazione a +4 °C per 18 ore è stata eseguita la separazione tra l'ormone legato e quello libero aggiungendo ai campioni 1 ml di una soluzione all'1% di charcoal e 0,025% di destrano, incubando a +4°C per 15 minuti e centrifugando a 4000 g per 4 minuti a +4 °C. Il supernatante, contenente l'ormone legato all'anticorpo, è stato versato in vials da scintillazione ed utilizzato per il conteggio della radioattività eseguita con un  $\beta$  counter a scintillazione liquida.

I parametri di validazione dell'analisi sono risultati i seguenti: sensibilità 0,26 pg/tubo, variabilità nel saggio 6,8% e tra i saggi 9,3%.

La specificità dell'anticorpo utilizzato è espressa dalle reazioni crociate riportate nella tabella seguente:

Cortisolo	100
Corticosterone	9,5
11 $\alpha$ -idrossiprogesterone	8,3
Cortisone	5,3
11 $\alpha$ -desossicortisolo	5,0
Progesterone	0,6
Desossicorticosterone	0,5
20 $\alpha$ -diidrocortisone	0,4
Testosterone	0,3
Aldosterone	0,1
Deidroepiandrosterone	<0,0001
5 $\alpha$ -pregnenolone	<0,0001
17 $\beta$ -estradiolo	<0,0001
Colesterolo	<0,0001

**Tabella 1:** Specificità, espressa in percentuale, di anticorpo utilizzato per il dosaggio del cortisolo in pelo e feci.

Per determinare il parallelismo tra lo standard di cortisolo e il cortisolo endogeno nei gatti e nei cani sono stati utilizzati campioni di pelo e feci di 3 animali, contenenti alte concentrazioni di cortisolo endogeno. I campioni sono stati diluiti con tampone fosfato 0,05 M pH 7,5 fino ad ottenere volumi di 50, 25, 10 e 5  $\mu$ l. Il parallelismo è stato valutato tra queste diluizioni seriali e il cortisolo standard (range tra 7,81 a 1000 pg/tubo, preparato in tampone fosfato).

## DETERMINAZIONE DELLE CONCENTRAZIONI

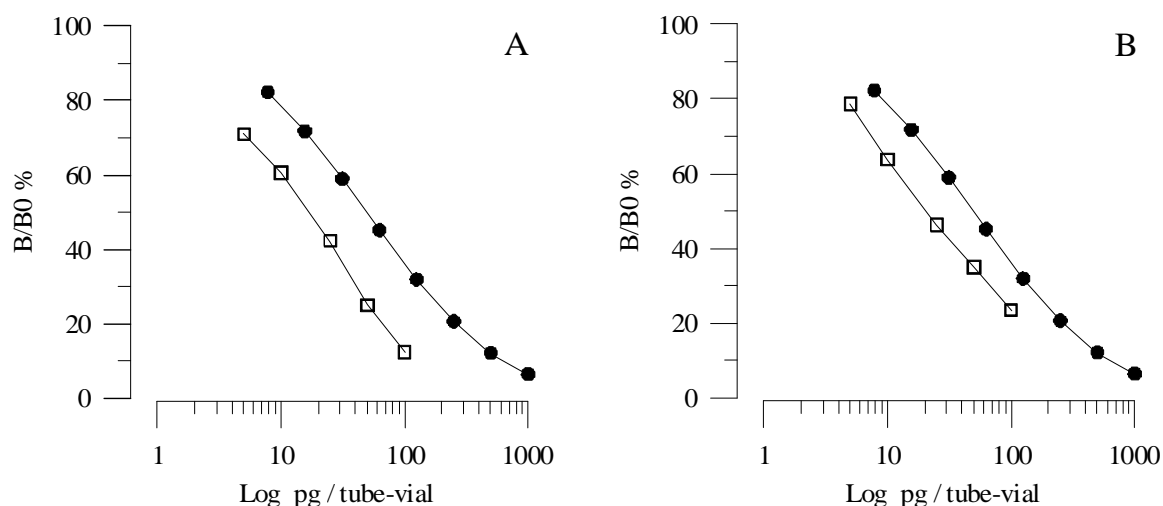
La conversione della radioattività dei campioni (cpm/vial) in unità di peso/peso (pg/mg) è stata eseguita utilizzando un programma di calcolo appositamente allestito (PRIAMO) (Motta e Degli Esposti, 1981)

## ANALISI STATISTICA

Il contenuto di cortisolo determinato nel pelo è stato testato contro le medie dei livelli di cortisolo fecale del periodo di ricrescita del pelo. La correlazione a ranghi di Spearman è stata usata per valutarne l'associazione. Un test di regressione non lineare è stato usato per valutare il parallelismo tra cortisolo standard ed endogeno. Per tutti i test statistici il livello di significatività (P) è stato posto, a priori, uguale a 0.05.

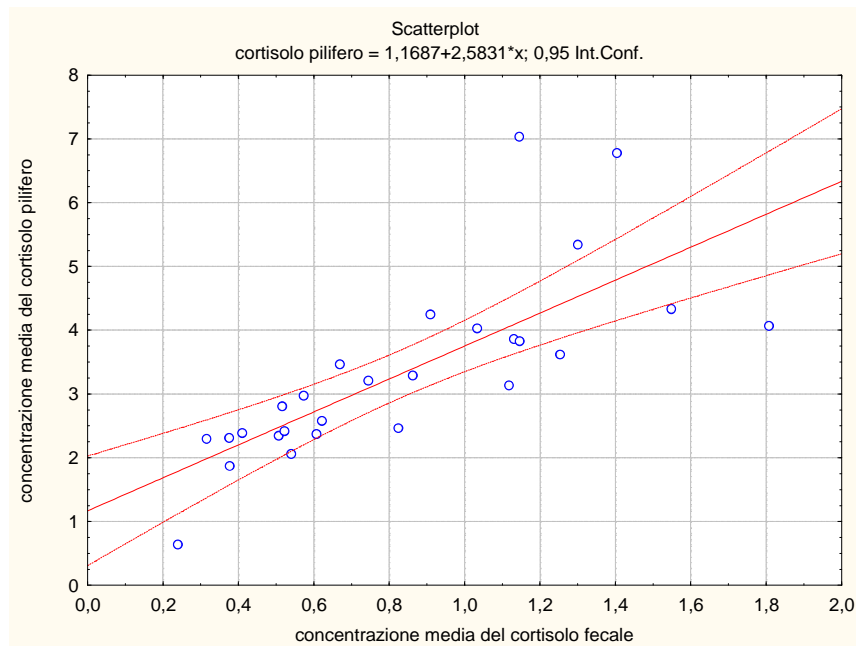
## RISULTATI

Un alto grado di parallelismo ( $P < 0,01$ ) è stato osservato tra la curva di cortisolo standard e i campioni diluiti. (Grafico 1).



**Grafico 1:** Parallelismo tra cortisolo standards (●) e diluizioni seriali di campioni (da 7.81 a 1000 pg/100  $\mu$ l tubo). Ogni punto (□) è la media di 3 campioni di peli (A) e feci (B), contenenti alti livelli endogeni di cortisolo diluito fino ad ottenere volumi di 100, 50, 25, 10 e 5  $\mu$ l

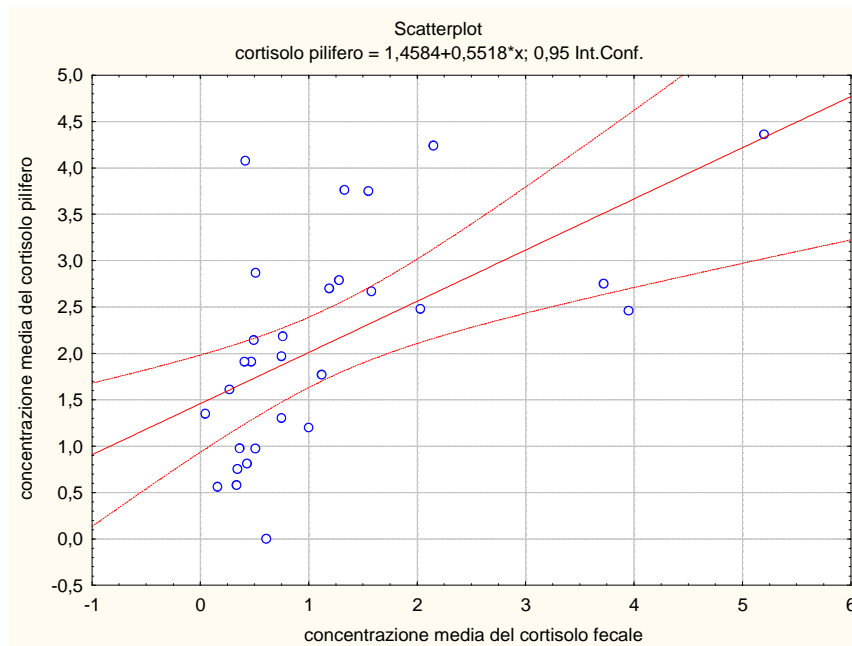
**Gatti:** il contenuto medio di cortisolo nei 27 campioni di pelo di gatto era di  $3,32 \pm 0,27$  pg/mg, mentre il contenuto medio di cortisolo nei 159 campioni di feci era di  $0,83 \pm 0,08$  pg/mg. E' stata trovata una significativa correlazione positiva tra i valori fecali e quelli piliferi ( $r_s = 0,902$ ,  $P < 0,001$ ; Grafico 2).



**Grafico 2:** Valori medi individuali di cortisolo fecale rispetto al contenuto individuale di cortisolo nel pelo nei campioni di gatto (N = 27). I valori sono espressi in pg/mg. Le linee tratteggiate rappresentano l'intervallo di confidenza ( $\pm 95\%$ ).

**Cani:** la correlazione tra i livelli di cortisolo di pelo e feci è stata determinata per ogni gruppo di cani. Poiché è stata trovata un'associazione significativa per entrambi i gruppi, l'analisi statistica è riportata solo per i dati complessivi. Il contenuto medio di cortisolo nei 29 campioni di pelo di cane era di  $2,10 \pm 0,22$  pg/mg, mentre il contenuto medio di cortisolo nei 711 campioni di feci era di  $1,16 \pm 0,23$  pg/mg. Il test di correlazione di Spearman ha rivelato una significativa correlazione positiva tra i livelli di cortisolo nel pelo e quelli fecali ( $r_s = 0.67$ ,  $P < 0.001$ ; Grafico 3).





**Grafico 3:** Valori medi individuali di cortisolo fecale rispetto al contenuto individuale di cortisolo nel pelo nei campioni di cane (N = 29). I valori sono espressi in pg/mg. Le linee tratteggiate rappresentano l'intervallo di confidenza ( $\pm 95\%$ ).

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo scopo del presente studio è stato valutare l'affidabilità e la praticità/utilità di un metodo per misurare il cortisolo nel pelo come indice dell'attività dell'asse HPA nei gatti e nei cani domestici.

I risultati mostrano che in entrambe le specie c'è una significativa correlazione positiva tra le concentrazioni di cortisolo determinate nelle feci e nel pelo.

Questa correlazione sembra confermare l'ipotesi che la misurazione del cortisolo sia fecale che pilifero riflettono, almeno in parte, la stessa attività adrenale. I risultati sono in accordo con quelli ottenuti da Davenport *et al.* (2006) sui macachi in condizioni controllate di laboratorio. In questa specie il contenuto di cortisolo nel pelo era positivamente correlato con quello salivare e aumentava in condizioni di stress prolungato.

Il fatto che il contenuto di cortisolo nel pelo correli con quello fecale e salivare in soggetti diversi e in condizioni di vita differenti incoraggia l'utilizzo di questa tecnica non invasiva per monitorare la risposta a stress prolungati.

Per quanto riguarda concentrazioni di cortisolo fecale nel gatto e nel cane ci sono poche pubblicazioni, per questo è stato difficile comparare i risultati con altri. I livelli di cortisolo fecale nei cani utilizzati in questo esperimento sono più bassi di quelli riportati

da altri autori (Schatz and Palme, 2001; De Palma *et al.*, 2005). Lo stesso vale per il gatto (Schatz and Palme, 2001; Young *et al.*, 2004). Questo, probabilmente, è dovuto alle differenti condizioni di vita dei soggetti presi in esame e alle differenti metodiche di analisi (RIA *vs* EIA).

Per quanto riguarda il pelo, invece, non ci sono altri lavori su cane e gatto. Perciò questi risultati hanno rappresentato il punto di inizio per ulteriori ricerche atte a chiarire le relazioni tra le condizioni ambientali e di vita di queste due specie e il contenuto di cortisolo nel pelo.

# GATTI

La capacità del gatto domestico di mostrare diversi modelli comportamentali a seconda degli *habitat* in cui si trova, cioè la variabilità intraspecifica nell'organizzazione spaziale, va dalla possibilità del gatto di vivere in gruppi ad alta densità, a quella di vivere come animale solitario e alle varie situazioni intermedie. Ciò rappresenta uno dei tratti più caratteristici di questo felino oltre a costituire un notevole vantaggio dal punto di vista evolutivo, definibile come plasticità comportamentale. I gruppi si possono quindi formare quando la disponibilità e la dispersione delle risorse alimentari permettono a due o più soggetti di vivere in stretta prossimità. Da quanto detto, si possono prendere in considerazione almeno tre situazioni di vita sociale dei gatti domestici, ovvero lo stile solitario, le colonie feline che si formano attorno alle matriarche ed i gruppi che sono costituiti artificialmente tramite l'intervento dell'uomo.

E' proprio quest'ultima situazione (rifugi, pensioni, allevamenti) che può provocare nell'animale uno stato di disagio e sofferenza dovuto alle forti limitazioni imposte alle esigenze comportamentali proprie della specie.

Nei rifugi per animali abbandonati le modalità di gestione e di cura degli animali confinati sono fattori critici. Quando i gatti vengono accolti in rifugi o in oasi feline, spesso vengono sistemati all'interno di gabbie singole; per alcuni soggetti, questo tipo di trattamento abbinato al contatto con le persone, così come le attività di gestione dei ricoveri stessi costituiscono una fonte di stress che facilita lo sviluppo di comportamenti estremamente difensivi. Altri soggetti, invece, non manifestano reazioni evidenti e apparentemente sembra si adattino alla nuova situazione, ma l'assenza di una reazione evidente può essere indice di uno stress molto più elevato (Bradshaw, 1996). Un soggetto può subire un certo stress anche quando alloggiato non in una gabbia singola, ma insieme ad altri animali. In questo caso lo stress può derivare da una recente cattura e susseguente spostamento dal proprio territorio, dalla densità degli animali nella struttura e dalla presenza di conspecifici estranei (Bradshaw, 1996).

Tutte queste situazioni possono portare gli animali ad una situazione di stress cronico con le conseguenze fisiologiche e comportamentali che ne derivano: da una parte una aumentata produzione di cortisolo e una aumentata sensibilità adrenocorticale all'ACTH, dall'altra depressione di alcuni comportamenti quali l'attività esplorativa ed il gioco ed aumento del tempo passato in allerta e/o al riparo dietro un nascondiglio.

Anche fattori individuali, specialmente il grado di socializzazione durante l'infanzia, possono influenzare lo stress legato alle situazioni ambientali di vita degli animali. La socializzazione è un importante fattore che influenza il livello di stress dei gatti nelle diverse tipologie di alloggio. Gatti che non sono socializzati verso conspecifici sono più stressati rispetto a gatti socializzati quando costretti a vivere in gruppi in cattività, mentre lo sono meno quando vengono messi in gabbie singole. In entrambi i tipi di sistemazione, poi, i gatti non socializzati verso le persone hanno un livello di stress maggiore rispetto ai gatti socializzati (Kessler e Turner, 1999).

Negli ambienti artificiali di cattività le maggiori fonti di stress per il gatto, oltre a quelle di tipo sociale, sono la povertà degli stimoli esterni e la ristrettezza degli spazi, con la conseguente impossibilità per l'animale di esprimere la maggior parte del proprio repertorio comportamentale.

Diversi esperimenti di arricchimento olfattivo e strutturale dimostrano l'efficacia di questa tecnica nell'ovviare al primo dei due problemi: l'introduzione di punti sopraelevati, nascondigli, giochi e stazioni di marcatura stimolano l'esecuzione di moduli comportamentali attivi e riducono il livello di stress.

Per quanto riguarda la quantità di spazio, è nota l'estrema adattabilità del gatto a questo parametro. Infatti, anche allo stato libero, lo si può trovare in gruppi di densità estremamente diverse, da meno di 5 animali per km<sup>2</sup> in gatti rinselvaticati di campagna, fino a 200 per km<sup>2</sup> in ambiente urbano (Liberg e Sandell, 1988); inoltre sono state misurate le dimensioni dei territori, sia di maschi che di femmine, riscontrando due estremi molto distanti: circa 120 km<sup>2</sup> come massimo e circa 0,03 km<sup>2</sup> come minimo (Liberg *et al.*, 2000).

Tuttavia, solo pochi studi si sono occupati di indagare quale sia lo spazio minimo di cui un gatto ha bisogno per vivere in un accettabile stato di benessere.

È comunque da sottolineare che una minima superficie pro-capite non garantisce da sola l'idoneità dell'*housing*; determinante è anche il grado di complessità dell'ambiente, che deve offrire agli animali una vasta scelta nell'utilizzo dello spazio e la possibilità di evitare le interazioni o lo sguardo dei conspecifici e dell'uomo ogni volta che ne sentono il bisogno. Idealmente ogni gatto dovrebbe avere a disposizione più di un nascondiglio e più tipologie di aree di riposo e di monitoraggio distribuite in minimo due locali separati.

Ciò premesso, gli scopi di questa ricerca, suddivisa in tre esperimenti, sono stati quelli di individuare i fattori di stress psico-sociale in gatti che vivono in gattile

analizzando i correlati comportamentali ed ormonali dello stress in questa condizione socio-ecologica, ricercando, in particolare, l'evidenza ormonale di uno stato di stress prolungato e la messa in atto di strategie comportamentali di contenimento dello stesso (**esperimento 1**), approfondire il ruolo della marcatura visivo-feromonale (**esperimento 2**) e infine, confrontare oasi feline di diversa estensione spaziale per valutare come varia lo stress nelle varie popolazioni feline in rapporto allo spazio disponibile e per fornire suggerimenti per l'allestimento di oasi feline con caratteristiche il più possibile confacenti alle peculiarità etologiche del gatto domestico (**esperimento 3**). Tutto ciò può servire da spunto per la formulazione di un'adeguata legislazione in merito; considerando che, per quanto concerne il gatto domestico, indicazioni ci sono fornite solamente dal DL N°116 del 27/01/1992 e dalla Delibera della Giunta regionale dell'Emilia Romagna N° 394 del 27/03/2006, le quali danno rispettivamente indicazioni sulle condizioni di detenzione dei gatti intesi come animali da laboratorio e sulle condizioni di benessere da adottare per gatti tenuti in negozi, pensioni, allevamenti e durante le esposizioni.

## MATERIALI E METODI

In questa sezione vengono riportati i metodi di analisi comuni ai tre esperimenti. All'interno di ciascun esperimento, invece, verranno messe in evidenza le caratteristiche specifiche quali l'ambiente di studio e i soggetti e le eventuali differenze di campionamento e di analisi.

### OSSERVAZIONI COMPORTAMENTALI E METODOLOGIE DI CAMPIONAMENTO

I metodi di campionamento degli eventi comportamentali esibiti dai soggetti dello studio sono stati: *Campionamento Comportamentale (Behaviour Sampling* - Martin e Bateson 1986; *All Occurrences Sampling* – Altmann, 1974) e a *Scansione* per l'intero gruppo e a *Focale* per ciascuno dei soggetti prescelti.

Il metodo “*Focal Animal Sampling*” o “*ad animale focale*”, consiste nell'osservare un soggetto scelto con metodo *random*, per un periodo di tempo ben definito, registrando la comparsa di determinati comportamenti esibiti durante ogni sessione di osservazione ed includenti sia azioni individuali sia interazioni con altri. Vengono valutate le “incidenze” totali relative alle azioni o interazioni di un individuo. La scelta dell'animale focale va effettuata all'inizio di ogni sessione di campionamento. La registrazione viene effettuata per la durata totale di ogni sessione di osservazione e per la somma totale di tempo durante il quale ogni individuo “focalizzato” risulta sempre visibile nel corso del campionamento (*time-in*). Tale metodologia offre la possibilità di rilevare, in modo standardizzato, un vasto numero di eventi, non altrettanto facilmente evidenziabili con l'impiego di altri metodi, consente inoltre di cogliere le varie situazioni in cui un individuo sia esecutore e/o ricevente di una determinata azione. Inoltre, assicura che tutti i soggetti vengano osservati per la stessa quantità di tempo. Con una appropriata scelta del numero di comportamenti da registrare, questa tecnica rappresenta, infine, una soluzione di campionamento appropriata nel caso di studi relativi al comportamento sociale spontaneo di uno o più individui nell'ambito del gruppo di appartenenza.

Con il *Behaviour Sampling* sull'intero gruppo, invece, si registrano tutti gli eventi dei comportamenti definiti di interesse messi in atto dai componenti del gruppo. Questo metodo evidenzia al meglio i comportamenti rari (agonistici).

Il metodo “*Scan Sampling*” consiste nel monitorare il comportamento di tutti i soggetti simultaneamente ed in maniera istantanea, o comunque in un intervallo di tempo molto breve, in modo che la registrazione si avvicini ad un campionamento simultaneo di tutti gli individui come se scattassimo una fotografia che ci permette di individuare il comportamento di tutti i soggetti presi in esame nello stesso momento. Tale procedimento consente di esaminare ad intervalli regolari l'intero gruppo e di ricavare una stima della percentuale di tempo complessivo che ciascun individuo dedica alle varie attività.

I metodi di registrazione utilizzati sono la “*registrazione continuata*” di tutte le occorrenze (dei comportamenti d'interesse) per tutto il gruppo e per i focali e quella “*istantanea*” per le scansioni. La durata dei comportamenti non è stata registrata.

I comportamenti sono distinti, a seconda del tempo di attività che implicano, in stati ed eventi. Tra i primi rientrano moduli comportamentali di lunga durata, quali azioni protratte, posizioni del corpo o parametri di prossimità. Gli eventi indicano, invece, moduli comportamentali di durata relativamente breve, quali atti e movimenti precisi e vocalizzazioni.

Le osservazioni comportamentali sono state effettuate sulla base di un etogramma compilato preventivamente secondo le indicazioni del UK Cat Behaviour Working Group (1995) e di Leyhausen (1979) con ampliamenti per rispondere alle necessità e finalità del presente studio (Tabella 2).

Sigla	Comportamento	Descrizione	Campionamento	Modificatore
-------	---------------	-------------	---------------	--------------

### **SOLITARI** ***POSTURE (Inattività)***

LoS	LIE ON SIDE	Sdraiato sul fianco in completo contatto col terreno, collo esteso o flessso, zampe distese.	SC	
LHS	LIE HALF SIDE	Sdraiato sul fianco dal torace in giù ma capo e spalle sollevati, zampe anteriori più o meno flesse (appoggio sui gomiti).	SC	
LV	LIE VENTRAL	Rannicchiato. Sdraiato sul ventre, zampe flesse, capo eretto.	SC	
LD	LIE DORSAL	Supino, sdraiato sul dorso.	SC	
LC	LIE CURLED	Acciambellato: diversi gradi.	SC	
CR	CROUCH	Sfinge. Sdraiato sul ventre, zampe posteriori rannicchiate/flesse sotto, anteriori distese dai gomiti, capo eretto.	SC	
ACC	ACCOVACCIATO	Solo mani e piedi in contatto col suolo, zampe flesse, tronco basso vicino al suolo e a questo parallelo. Una zampa anteriore può essere flessa e appoggiata al suolo lateralmente	SC	

SIT	SIT	Seduto su treno posteriore, zampe anteriori estese	SC	
ST	STAND	Solo mani e piedi in contatto col suolo, zampe in estensione	SC	

### **LOCOMOZIONE (Attività)**

WK	WALK	Cammina, percorre un tratto senza ispezionare, annusare etc	SC	
PA	PACE	Cammina avanti e indietro lungo uno stesso percorso, come un animale in gabbia	SC	
WKL	WALK LOW	Cammina/trotterella abbassato, coda bassa o sotto ventre, furtivo.	SC	
RUN	RUN	Corsa al galoppo più o meno rapida	SC	
FRZ	FREEZE (anche agonistico)	Immobilizzazione improvvisa con muscoli tesi.	SC+F	

### **STATI (Attività-inattività)**

SL o REST	SLEEP/REST	Immobile, inattivo, occhi chiusi, in posizione di riposo (LoS, LV, LD, LC). Solo a volte è possibile distinguere se si tratta di rest (orecchie mosse di tanto in tanto, reattivo a stimoli, etc) o sleep (non si sveglia se non con stimoli forti, russa, si muove in sogno). A meno che non sia chiaro che sta dormendo, prevale la registrazione della posizione	SC	
HID	HIDE/OUT of SIGHT	Si nasconde o è semplicemente fuori visuale. E' meglio registrare il comportamento con parsimonia a meno che non sia chiaro che il soggetto si sta nascondendo	SC	
AL	ALERT	Inattivo ma attento, occhi spalancati, orecchie pronte ad orientarsi sulla provenienza dei rumori, etc.	SC	
PL	SOLITARY PLAY	Gioco solitario, con o senza oggetti. E' possibile aggiungere note sul tipo di gioco (corse e arrampicate oppure predatorio con animaletti o oggetti)	SC	
SPL	SOCIAL PLAY	Due o più gatti giocano assieme	SC	

### **ATTIVITA' DI MANTENIMENTO (Indicatori di stress)**

DR	DRINK	Lappa liquido	SC	Oggetto
EAT	FEED or EAT	Mangia	SC	Oggetto
SGR	SELFROOM	Lecca proprio pelo o lo mordicchia con incisivi, lecca zampa e con questa si strofina il capo, occasionali grattate	SC+F+B	
SGR d.p.	SELFROOM DOPO PASTO	"Toeletatura" dopo pasto limitato alla pettorina, alle fauci e alle zampe anteriori, immediatamente dopo aver mangiato	SC+F+B	
SSC	SELFSCRATCH	Grattarsi con zampe posteriori vari distretti corporei. Ha luogo "in treni di grattate": va registrato l'inizio di ciascuno, non il numero di singoli atti di grattatura	SC+F+B	
BS	BODY SHAKE	Scrollarsi (tutto il corpo)	SC+F+B	
LS	LEG SHAKE	Il gatto muove rapidamente la zampa lateralmente e all'indietro facendola fremere	SC+F+B	



HS	HEAD SHAKE	Il gatto muove rapidamente la testa da un lato all'altro (scrolla la testa, nel movimento possono essere coinvolte anche le spalle)	$SC+F+B$	
YWN	YAWN	Sbadiglio	$SC+F+B$	
SR	SKIN ROLL	Pelle vibra in seguito/contemporaneamente a intense scrollate di tutto o parte del corpo, appaiono “rotoli” di pelle dorsali, movimenti “inconsulti” (balzi, grattate, scatti), aria allucinata e spaventata con orecchie arretrate, spesso brevi fughe.	$SC+F+B$	

### **MARCATURA / ISPEZIONE / ESCREZIONE**

RLM	ROLL MARK	Rotolarsi al suolo sul dorso (diverso da: LD con zampe estese, rilassato, e da ROLL OVER / SOCIAL ROLL amichevole, sottomissivo o per atterramento, che presuppone presenza altro gatto) strofinando dorso collo e capo contro il substrato; con diversi gradi di velocità e postura zampe. Detto anche: BRS =BODY RUB SOIL	$SC+F+B$	Posizione Substrato
BRM	BODY RUB MARK o RUB OBJECT (fianchi etc)	Strofina corpo (collo, fianchi) contro oggetto o substrato	$SC+F+B$	Posizione Substrato
FHM	FOREHEAD MARK (per lo più affiliativo)	Strofina la fronte contro oggetto o substrato	$SC+F+B$	Posizione Substrato
CM	CHEEK MARK (& lip)	Strofina guance e labbra contro oggetto o substrato	$SC+F+B$	Posizione Substrato
CRM	CHIN RUB MARK	Strofina il mento contro oggetto o substrato	$SC+F+B$	Posizione Substrato
TRM	TAIL RUB MARK	Coda appoggiata, avvolta o fatta scorrere attorno ad un oggetto o substrato	$SC+F+B$	Posizione Substrato
OS	OBJ.SCRATCH	Graffiate ripetute su superfici ruvide, con unghie estese o con soli polpastrelli. Verticale o orizzontale.	$SC+F+B$	Posizione Substrato
URI	URINATE	Scava una buchetta o cerca luogo adatto annusando attorno, si abbassa e urina. Femmine spingono treno post. più avanti dei maschi	$SC+F+B$	Posizione Substrato
CU	COVER URINE	Copre o cerca di coprire l'urina, radunando materiale con zampe anteriori. Se l'urina è sua e appena fatta, dopo minzione si gira, annusa e poi agisce con zampa. Se non indicato, l'urina è lasciata scoperta senza tentativo di coprirla	$SC+F+B$	Posizione Substrato
SAU	SCRATCH after URINE	L'azione di copertura si estende a distanza, anche in verticale e su substrati inamovibili.	$SC+F+B$	Posizione Substrato
DEF	DEFECATE	Scava buchetta o cerca luogo adatto annusando attorno, si abbassa e defeca	$SCSF+B$	Posizione Substrato
CF	COVER FAECES	Copre o cerca di coprire feci, radunando materiale con zampe anteriori. Se feci sono sue e appena fatte, dopo defec. si gira, annusa, poi copre. Se non viene registrato "CF", significa che le feci sono lasciate scoperte senza tentativo di coprirle	$SC+F+B$	Posizione Substrato
SAF	SCRATCH after FAECES	L'azione di copertura si estende a distanza, anche in verticale e su substrati inamovibili.	$SC+F+B$	Posizione Substrato
SPR	SPRAY	Dirige getto di urina contro oggetto/substr., (in orizzontale o altrimenti), restando in piedi -spesso	$SC+F+B$	Posizione Substrato

		in piena estensione (sulle punta delle dita) o con accosciamento parziale. La coda è tenuta alta e verticale e vibra (cfr. QUIVER). La quantità di urina escreta è variabile.		
PSP	PSEUDO-SPRAY	Volge il treno posteriore verso un oggetto/substrato, alza la coda e la fa vibrare (QUIVER) ma non viene emessa urina apprezzabile (forse solo feromoni)	SC+F+B	Posizione Substrato
SHL	SCRAPE HIND LEGS	Le zampe posteriori vengono strofinate vigorosamente e alternativamente all'indietro (come cani). Per lo più maschi interi dopo marcatura escretoria	SC+F+B	Posizione Substrato
EXP	EXPLORE	Procede lentamente, annusando oggetti, ispezionando e perlustrando territorio circostante	SC	Posizione
PEX	PASSIVE EXPLORE	Scansione dell'ambiente restando fermo (seduto o in piedi): capo ruotato per perlustrazione visivo-uditiva	SC	
SNA	SNIFF AIR	Naso non vicino a nessun particolare oggetto.	F+B	
SNIFF	SNIFF OBJECT	Un gatto annusa un oggetto	SC+F	Posizione oggetto
SCS	SNIFF CAT SCENT	Ispeziona col naso un luogo che un altro gatto ha precedentemente marcato (urine, feci, spray, scratch, BRM e altri strofinamenti etc).	F+B	Posizione, oggetto, identità scent se nota
FLH	FLEHMEN	Fauci leggermente aperte, labbro superiore sollevato, capo sollevato, lingua può essere estroflessa. Generalmente dopo investigazione oggetto, luogo, gatto, aria.	F+B	
ISP	INSPECT OBJECT	Ispeziona minuziosamente un oggetto/substrato	SC+F+B	

### **POSTURE E MOVIMENTI CODA**

TUP	HIGH tail - TAIL UP (anche affiliativo)	Portata alta verticale. Può indicare un generico interesse/curiosità e buona disposizione se il gatto non è in un contesto sociale, altrimenti è una forma di saluto, per lo più da parte di individui giovani o subordinati	F+B	Se in contesto sociale
SWT	SWISH	Scodinzolio che interessa intera lunghezza.	F+B	
TWT	TWITCH	Movimento improvviso di parte della coda in senso orizzontale o verticale.	F+B	
SLT	SLAP	Coda velocemente sbattuta al suolo.	F+B	
QUT	QUIVER	Vibrazione (tremolio) della coda già alta verticale o durante sua erezione	F+B	

### **VARIE**

HST	HOOK STEEL	Prende il cibo usando la zampa come uncino	F+B	
PAN	PANTING	Respiri brevi e profondi in rapida successione a bocca aperta	F+B	

### **Richiami a lunga distanza**

OA	OÂÂO-OÂÂO	Chiamata a lunga distanza	F+B	
CTW	CATERWOUL	Vocalizzazione usata nel periodo degli accoppiamenti	F+B	

## **SOCIALI** **NEUTRI**

WBY	WALK BY-PASS BY	Passa a fianco di un altro gatto	$F+B$	Ricevente
APP	APPROACH	Si muove verso un altro gatto	$F+B$	Ricevente
FLW	FOLLOW	Procede dietro ad un altro gatto	$F+B$	Ricevente
MAW	MOVE AWAY	Un gatto si allontana da un altro	$F$	Ricevente
ENC	ENCIRCLE	Gira attorno ad un altro gatto, accerchiandolo	$F+B$	Ricevente
AV	AVOID	Evita di passare o stare molto vicino ad un altro.	$F+B$	Ricevente
ESI	HESITATE	Un gatto esita nel passare vicino o nell'interagire con un altro soggetto	$F$	Ricevente

## **AFFILIATIVI O AFFINITIVI**

BLK	BLINK	Ammicciamento fatto verso un altro soggetto.	$F+B$	Ricevente
BC	BACK CURVE	Arcua dorso, coda generalmente alta e il gatto può rizzarsi sulla punta delle dita.	$F+B$	Ricevente
WWC	WALK with CAT	Due gatti procedono affiancati "in contatto" spesso tenendo le code attorcigliate. RECIPROCO	$SC+F+B$	Ricevente
IWT	INTER-WINED TAILS	Code attorcigliate. RECIPROCO	$F+B$	Ricevente
TEM	TAIL EMBRACE	Abbraccia con la coda	$F+B$	Ricevente
WC	WITH CAT	Si pone adiacente o in contatto con uno o più altri gatti. Una distanza specifica può essere utilizzata come criterio di misura (eg. entro 25 cm)	$F+B$	Ricevente
SNC	SNIFF CAT	Annusa il corpo di un altro gatto (fianchi, dorso)	$F+B$	Ricevente
NSN	NOSE SNIFF	Annusa il naso di un altro gatto	$F+B$	Ricevente
SFH	SNIFF (FORE) HEAD	Annusa la fronte/testa di un altro gatto	$F+B$	Ricevente
ASN	ANAL SNIFF	Annusa l'area perianale di un altro gatto (comprese cosce)	$F+B$	Ricevente
SNT	SNIFF TAIL	Annusa la coda di un altro gatto	$F+B$	Ricevente
NN	TOUCH NOSES	NOSE-NOSE. Due gatti si toccano (annusano) l'un l'altro con il naso. Spesso fatto stando in piedi e di fronte l'uno all'altro. RECIPROCO	$F+B$	Ricevente
SOR	SOCIAL ROLL (anche sottomissione)	Rotola a terra in presenza di un altro. Può essere fatto in maniera amichevole e rilassata o in un contesto di sottomissione (zampe spalancate e ventre più o meno esposto: vedi SUBMISSIVE)	$F+B$	Ricevente
KND	KNEADING	"Impastare" come per i gattini ma fatto da adulti su qualcuno o su substrato inerte	$SC+F+B$	Ricevente
FHM	FOREHEAD MARK CAT	Strofina la fronte su qualcuno	$SC+F+B$	Ricevente
HRC	HEAD RUB CAT	Strofina la testa su un altro: possono essere usate fronte e/o guance	$SC+F+B$	Ricevente
BRC	BODY RUB CAT	Strofina il proprio corpo (spalle, fianchi fino anche alla coda compresa) su un altro gatto (code possono essere o meno intrecciate)	$SC+F+B$	Ricevente

AGR	ALLO-GROOM	Lecca in maniera rilassata un altro gatto (gli fa il grooming)	SC+F	Ricevente
SPL	SOCIAL PLAY	Gioco sociale di tutti i tipi purché coinvolga 2 o più individui (è possibile indicare il tipo di gioco: con oggetto, lotta, etc)	SC+F	Compagno

### **AGONISTICI GENERICI (reattività)**

PIL	PILO-ERECTION	Un gatto solleva e gonfia il pelo su nuca, spalle, dorso o coda, assumendo un aspetto gonfiato. In casi estremi un maggior quantitativo di pelo viene rizzato. Spesso con BODY ARCH	F+B	Ricevente
RIS	RISE	Il gatto si innervosisce, si solleva, si irrigidisce (insorgere, rivoltarsi, sollevarsi)	F+B	Ricevente

### **AGONISTICI DI SOSTEGNO**

APCL	APPEASING CONFL. INTERF.	Interferenza di tipo affiliativo nei conflitti tra altri soggetti	SC+F+B	Descriz.
ACL	AGGRESSIVE CONFL. INTERF.	Interferenza aggressiva in un conflitto fra terzi	SC+F+B	Complessa
Lna	LEAN AGAINST	Animale che deve affrontare un soggetto si appoggia fisicamente ad un terzo	F+B	

### **AGGRESSIVI/ CONTRO-AGGRESSIVI**

*No contatto; no movimenti in avanti; in ordine di grado crescente di severità*

STA	STARE	Un gatto ne fissa un altro e non è facilmente distratto dall'attività circostante	F+B	Ricevente
THR	THREAT	Lieve minaccia, composta dal fissare, dalle orecchie dritte in avanti, da rigidità, posizione di minaccia generica	SC+F+B	Ricevente
SPO	DISPLACE	Un gatto ne sposta un altro da una risorsa	F	Ricevente
NFX	NECK FLEX	Un gatto mostra una marcata flessione verso il basso del collo. Il capo è ruotato a fronteggiare un altro gatto se il corpo è disposto lateralmente. Può manifestarsi contemporaneamente a BODY ARCH e può essere eseguito mentre il gatto è fermo in piedi (o parzialmente accosciato) o mentre si muove lateralmente	SC+F+B	Ricevente
HPT	HEAD POINTING	Un gatto sta in piedi rigido e muove il capo molto lentamente, rispecchiando i movimenti del capo di un altro gatto. Il naso punta in alto e il mento è sollevato. Si trova invariabilmente in un contesto aggressivo, spesso assieme a PILOEREZIONE	F+B	Ricevente
BA	BODY ARCH	Un gatto arcua il dorso verso l'alto e sta in piedi rigido. La coda è generalmente curva in maniera tesa e può esserci PILOEREZIONE. Può sollevarsi sulla punta delle dita. Si accompagna tipicamente a NECK FLEX	F+B	Ricevente
WAW	GNAW-WAW (+SUONO)	Gnawing (movimento delle mandibole come per masticare) con emissione di suono caratteristico; può essere accompagnato da fissare (stare), oppure da flessione laterale del collo, posizione abbassata del corpo ed evitamento dello sguardo	SC+F+B	Ricevente

*No contatto; movimenti in avanti; in ordine di grado crescente di severità*

RPW	RAISE PAW (at)	Un gatto solleva la zampa contro un altro in gesto di minaccia, ma non sferra il colpo	<i>F</i>	Ricevente
STK	STALK	Un gatto si avvicina ad un altro o ad una preda cercando di non allertarla (caccia-gioco).	<i>F+B</i>	Ricevente
LPF	LEAP FORWARD	Gettarsi in avanti ad iniziare inseguimento: balzare contro	<i>SC+F+B</i>	Ricevente
CHA	CHASE	Un gatto corre all'inseguimento di un altro	<i>SC+F+B</i>	Ricevente
ATT	ATTACK	Un gatto si lancia verso un altro cercando il combattimento fisico	<i>SC+F+B</i>	Ricevente
ASC	Aggr. SCREAMS	Urla e suoni striduli (shriek) emessi all'atto di aggredire un altro individuo; tipicamente il corpo è raccolto per il balzo, le orecchie arretrate, l'atteggiamento aggressivo, l'espressione "malevola"	<i>SC+F</i>	Ricevente

*Contatto fisico; in ordine di grado crescente di severità*

LC	LICK CAT	E' una dimostrazione di dominanza, può essere seguito da morsetti; l'"aggressore" lecca bruscamente la "vittima" sulla nuca, spalle o sopra la radice della coda	<i>SC+F+B</i>	Ricevente
RPW	RAISE PAW (at)	Un gatto solleva una zampa anteriore come per colpirne un altro. Non c'è contatto	<i>F+B</i>	Ricevente
PAW	PAW (at)	Un gatto dà una zampata "a buffetto" ad un altro individuo, ad artigli retratti	<i>SC+F+B</i>	Ricevente
CUF	CUFF	Un gatto ne colpisce un altro con la zampa anteriore, di solito con artigli estratti. Come PAW, ma più grave e violento	<i>SC+F</i>	Ricevente
FHP	FOREHEAD PUSH	Due gatti si confrontano testa a testa in NECK FLEX, il "dominante" spinge con la propria la fronte dell'altro premendo lentamente	<i>F+B</i>	Ricevente
WRS	WRESTLE (with)	Un gatto si azzuffa con un altro in un corpo a corpo che prevede: presa, "abbraccio", trazione, e graffiatura con le zampe posteriori (a "sventrare" l'oppositore).	<i>SC+F+B</i>	Ricevente
FGT	FIGHT (with)	Due gatti si impegnano in un combattimento fisico, spesso avvinghiati come in WRESTLE, graffiando e mordendo quando si rovesciano l'un l'altro; include vocalizzazioni.	<i>SC+F+B</i>	Ricevente
NIP	NON-SERIOUS BITE	Un gatto cerca di addentare (snap) o riesce a mordere a pizzico un altro animale.	<i>F</i>	Ricevente
2CB	2CUFFS+ CLUB-BITE	Un gatto dà un doppio cuff con entrambe le mani quasi ad abbraccio, nella zona compresa fra le 2 "sberle", assesta un morso a randellata che non lede la cute ma traumatizza i tessuti.	<i>F</i>	Ricevente
BIT	SERIOUS BITE	Vero e proprio morso	<i>F+B</i>	Ricevente

**CONTROAGGRESSIVI (in risposta ad una aggressione o minaccia)***In ordine di grado crescente di severità*

NOR	NO REACTION - IGNORE	Il gatto non mostra reazioni di sorta, sembra ignorare l'avvenuta "aggressione". Dato in risposta	<i>SC+F+B</i>	Va registrato come
-----	----------------------	---	---------------	--------------------

		soprattutto a: RAISE PAW AT, PAW AT, mild CUFF, LEAP FORWARD.		azione del ricevente
SCH	(RAISE) PAWat-(RAISE) PAWat SCHERMA	Il gatto cui è stato rivolto un RAISE PAW o un PAW AT risponde quasi simultaneamente con un RAISE PAW o un PAW AT. Per lo più non vi è contatto. L'azione è velocissima. Di solito avviene fra pari rango. Ne esiste una versione lenta, enfaticizzata, a distanza. AZIONE RECIPROCA	SC+F+B	
SFC	SILENT FROZEN CONTEST	Due gatti si fronteggiano in posture "congelate" (spesso uno da sopra in threat, e l'altro da sotto rianchiato volge il muso con orecchie arretrate, mostrandosi pronto a reagire). AZIONE RECIPROCA	SC+F+B	

### **SOTTOMISSIVI**

*No contatto fisico; movimenti di evitamento; in ordine di grado crescente di severità (+/- SUONI)*

AVI	AVOID INTERACTION	Un gatto risponde al comportamento di un altro evitandolo, e.g. evitando il contatto oculare o non avvicinandosi	F+B	Reazione/ ricevente
STR	STARTLED	Trasalire sorpreso	F+B	
RTR	RETREAT	Un gatto si allontana da un altro, continuando a tenerlo d'occhio	F+B	Reazione/ ricevente
FLE	FLEE/ FLIGHT	Un gatto fugge via da un altro	SC+F+B	Reazione
PDM	DEFENSIVE THREAT POSTURE	Un gatto reagisce all'aggressione di un altro mettendosi in posizione difensiva, ossia schiacciata al suolo, ma nello stesso tempo si mostra pronto a reagire se l'altro non si persuade a concludere l'aggressione	SC+F	Reazione/ ricevente
SCR	SCREAM	Un gatto urla spaventato in reazione all'aggressione di un altro	SC+F	Reazione/ ricevente

*No contatto fisico; reazione di paura o comp. legato allo stress*

DTP	Double Tongue Protrusion-Oral Beh.	Il gatto si lecca il naso/labbro superiore ripetutamente (tipicamente in serie di 2 leccate) e rapidamente.	F+B	
-----	--	---	-----	--

*Sottomissione spontanea e/o comportamento suadente*

LOH	LOW HEAD	Si avvicina o si volge verso il soggetto "aggressore" tenendo la testa abbassata; può anche essere un modo di avvicinarsi da subordinato e in questo caso non si tratta di una reazione, quindi va indicata l'identità del soggetto verso cui è rivolto il comportamento	F	Reazione/ ricevente
SRL	SOCIAL ROLL	cfr. Affiliativi		Reazione/ ricevente

### **SUONI**

*Reazione di paura, aggressiva, legata allo stress; in ordine di grado crescente di severità*

MEOW	MEOW	Un gatto emette un distinto suono, generalmente nel caso in cui voglia ottenere qualcosa da un altro gatto (solitamente cibo)	F+B	
HIS	HISS	Suono SSSS protratto, soffiata sibilante senza emissione di voce	F+B	Reazione/ ricevente

SPIT	SPIT	Esalazione improvvisa, breve, esplosiva, spesso accompagnata da un movimento violento	$F+B$	Reazione/ ricevente
GRW	GROWL	Suono basso e rombante. "RINGHIO"	$F+B$	Reazione/ ricevente
MOWL	MOWL	Un gatto emette un suono nasale accorciato; viene usato invariabilmente in un contesto aggressivo	$F+B$	Reazione/ ricevente

### *Suoni amichevoli*

BRU	BRRR	Suono festoso di saluto (onomatopeico)	$F+B$	
PUR	PURR	Suono caratteristico, basso e ritmico emesso da torace e gola, prodotto sia in esalazione sia in inalazione. FARE LE FUSA	$F+B$	

### **SESSUALE**

PMS	PATROL MATE SEARCH	Il gatto gironzola annusando oggetti ed osservando altri animali, fermandosi periodicamente e marcando con spruzzi d'urina o con ghiandole cutanee; associato a vocalizzi	$SC+F+B$	
MNT	MOUNT	Un gatto tenta la penetrazione senza riuscirci. Comportamento spesso accompagnato da movimenti delle zampe posteriori lungo i fianchi del gatto che riceve l'approccio, mentre trattiene quest'ultimo fermamente per la collottola	$F+B$	
COP	COPULATION	Un maschio monta una femmina e riesce a penetrarla. Comportamento caratterizzato spesso da: femmina che emette un suono acuto al momento dell'eiaculazione e si divincola dalla stretta del maschio (girandosi verso di lui). È generalmente preceduto da diversi tentativi di monta (MOUNT) dal calpestio delle zampe posteriori e dalla presa per la collottola tramite morso alla nuca. Anche la femmina esegue uno scalpiccio con le zampe posteriori e assume la posizione di lordosi (LORDOSIS)	$F+B$	
NNP	NAPE NIP (NAPNIP)	Morso a livello della nuca	$F+B$	
LRD	LORDOSIS	Una femmina solleva il treno posteriore per presentare i genitali a un maschio (o altro) quando in stato recettivo estrale. Il ventre è premuto presso il suolo e spesso la gatta muove ritmicamente le zampe posteriori.	$F+B$	
OEWS	OESTRUS WALK	Una femmina in estro cammina per brevi distanze alzando la coda, sollecitando i maschi, e spesso tornando sui suoi passi o muovendosi in cerchi. Può tornare indietro più volte di corsa per strusciarsi sul maschio etc.	$SC+F+B$	

**Tabella 2:** Etogramma utilizzato nel corso della sperimentazione. Nella prima colonna sono riportate le sigle che identificano ciascun comportamento; nella seconda e terza colonna il comportamento con la relativa descrizione; nella quarta colonna è riportato quando il comportamento viene campionato e registrato ( $SC$  = scansioni,  $F$  = focali e  $B$  = *Behaviour Sampling*) mentre nella quinta il modificatore verso il quale il comportamento è rivolto.

Durante il campionamento ad animale focale ed il campionamento comportamentale gli "stati" sono stati registrati una sola volta, al loro inizio, indipendentemente dalla durata; se il comportamento si ripresentava dopo



un'interruzione uguale o maggiore a 15 secondi veniva registrato nuovamente. Per alcune azioni, quali ad esempio la marcatura, sono stati registrati anche il tipo di oggetto (o substrato) a cui era diretto il comportamento e la posizione del soggetto all'interno del gattile, relativamente alle aree in cui ogni oasi è stata arbitrariamente suddivisa e l'eventuale prossimità con altri individui (entro 25-30 cm).

Le interazioni sono state registrate secondo il seguente schema:

- soggetto / comportamento / oggetto o substrato
- soggetto / comportamento, comportamento / oggetto o substrato
- soggetto / comportamento / soggetto ricevente / comportamento.

Le azioni isolate sono state distinte da quelle concatenate.

L'ordine con cui sono stati osservati gli individui è stato randomizzato (Lehner, 1979) e variato in maniera da garantire una esatta e parimetrica rappresentazione dei campionamenti nell'ambito delle fasce orarie.

Le osservazioni sono state precedute da un periodo di alcuni giorni, durante il quale l'osservatore si è accertato di riconoscere i soggetti in ogni condizione. Questo periodo ha altresì permesso ai gatti di assuefarsi alla presenza dell'osservatore.

Per quanto concerne la raccolta dei dati, questa è avvenuta attraverso l'uso di un registratore, accompagnato da supporto cartaceo e ad una distanza tale da non interferire con lo svolgersi delle azioni.

---

## TRATTAMENTO DEI DATI

---

### COMPORTEMENTO: CAMPIONAMENTO A SCANSIONE

Per ogni individuo sono state sommate le occorrenze di ciascun comportamento. I totali dei comportamenti affini (categorie o classi comportamentali) sono stati successivamente sommati, al fine di ovviare all'inconveniente dei comportamenti rari. Tutti i dati sono stati calcolati globalmente e suddivisi per sesso. I comportamenti a scansione sono stati standardizzati in base al numero totale di scansioni effettuate.

I comportamenti campionati a scansione sono stati raggruppati nelle seguenti categorie, solo alcune delle quali sono state poi analizzate:

1. inattività = tutte le posture
2. attività = gioco solitario e locomozione
3. esplorazione-ispezione olfattiva = *explore*, *passive explore*, ispezione, *sniff air*, *sniff object*



4. marcatura = marcatura per strofinamento capo (facciale), corpo, coda, per rotolamento al suolo, per spruzzo e pseudo-spruzzo urinario, per graffiatura di superfici
5. comportamenti affiliativi = strofinamento sociale (testa, coda, corpo), gioco sociale, contatto naso-naso, *back curve* e *allogroom*
6. *shake-DTP* = scrollare capo-corpo-arto, *skin roll*, comportamento orale (a volte addizionato al grattarsi = *shake-DTP-SSC*)
7. comportamenti auto-diretti = *self-groom*, grattarsi, sbadigliare
8. comportamenti o *markers* comportamentali di stress = punto 6 + punto 7
9. agonistici = tutti i comportamenti agonistici
10. incertezza-paura-sottomissione = comportamenti denotanti allarme ed evitamento, camminare bassi, esitazione, rubare il cibo arpionandolo, immobilizzazione improvvisa, reazione di sorpresa, ritirarsi, fuggire, postura di minaccia difensiva, *social roll* sottomissivo
11. inattività semplice = *stand*, *sit*, accovacciato
12. posture difensive = *crouch*, *lie ventral*, *lie halfside*
13. riposo = *lie on side*, *lie curled*, *rest*
14. riposo confidente o fiducioso = *lie dorsal*
15. comportamenti pro-sociali = tutte le "annusate" dirette ad un altro gatto
16. attività di mantenimento = bere, mangiare, defecare, urinare, coprire entrambe le deiezioni, toelettatura dopo-pasto.

## COMPORTAMENTO: CAMPIONAMENTO COMPORTAMENTALE E A FOCAL

I dati sono stati divisi in due gruppi: comportamenti “solitari” e comportamenti “sociali”. Per comportamenti “solitari” si intendono, oltre ai veri comportamenti solitari (attività di mantenimento, posture, comportamenti auto-diretti), anche quei comportamenti che non prevedono un ricevente immediato o evidente, facendo perciò rientrare in questo gruppo anche quei comportamenti che in realtà appartengono all’ambito della comunicazione (attività di marcatura). In questo ambito “solitari” si riferisce quindi alla modalità di campionamento e registrazione, non rigorosamente alla motivazione del soggetto.

I comportamenti sociali (che, invece, per definizione, prevedono un ricevente riconoscibile) sono stati suddivisi in agonistici, affiliativi e neutri. Per questi ultimi si

intendono quei comportamenti nei quali non è possibile distinguere una evidente motivazione da parte dell'animale. Anche in questo caso sono state eseguite le somme delle occorrenze dei singoli comportamenti, poi accorpate in categorie o classi di comportamenti affini. Tutti i risultati sono stati calcolati per tutti gli animali e per i due sessi.

Dai comportamenti campionati a focale sono state ricavate matrici soggetto-ricevente per i comportamenti affiliativi, agonistici, neutri e misti (approccio "neutro", reazione agonistica).

I comportamenti campionati a focale sono stati raggruppati nelle seguenti categorie, solo alcune delle quali sono state poi analizzate:

1. benessere = gioco solitario + "fare la pasta" + "fare le fusa"
2. attività di mantenimento = defecare, urinare, coprire entrambe le deiezioni, toelettatura dopo-pasto
3. ispezione olfattiva = ispezione, *sniff air*, *sniff object*, *flehmen*, *sniff cat scent*
4. marcatura per strofinamento = marcatura per strofinamento capo (facciale), corpo, coda e per rotolamento
5. marcatura per graffiatura = marcatura per graffiatura di superfici con zampe anteriori, con zampe anteriori dopo feci o urina, con posteriori dopo feci o urina
6. marcatura urinaria = marcatura per spruzzo-pseudospruzzo di urina
7. marcatura globale = punto 4 + punto 5 + punto 6
8. comportamenti affiliativi = strofinamento sociale (fronte, testa, coda, corpo, camminare e sedere con gatto, intrecciare le code), gioco sociale e invito al gioco, contatto naso-naso, *social roll* affiliativo, *allogroom*, *back curve*, *blink*, *tail up*, tutte le "annusate" dirette ad un altro gatto, approccio, seguire, passare accanto
9. *shake-DTP* = scrollare capo-corpo-arto, *skin roll*, comportamento orale (a volte addizionato al grattarsi = *shake-DTP-SSC*)
10. comportamenti auto-diretti = *self-groom*, grattarsi, sbadigliare
11. comportamenti o *markers* comportamentali di stress = punto 9 + punto 10
12. agonistici = tutti i comportamenti agonistici
13. incertezza-paura-sottomissione = comportamenti denotanti allarme ed evitamento, testa bassa, esitazione, rubare il cibo arpionandolo,

immobilizzazione improvvisa, reazione di sorpresa, andarsene, ritirarsi, fuggire, postura di minaccia difensiva, *social roll* sottomissivo.

---

## ANALISI STATISTICA

Sono stati utilizzati test non parametrici:

- test di correlazione a ranghi di Spearman, per l'esplorazione delle associazioni interne al comportamento, alle concentrazioni ormonali presenti nelle feci e nel pelo e fra occorrenze comportamentali e concentrazioni ormonali;
- test U di Mann-Whitney per l'esplorazione delle differenze fra i sessi e fra tutti gli altri campioni indipendenti;
- Kruskal-Wallis ANOVA + Test della Mediana per saggiare contemporaneamente le differenze tra più campioni indipendenti, per ormoni e comportamento.

Il livello di significatività è stato fissato a  $P < 0,05$ .

## ESPERIMENTO 1 – STRESS E COMPORTAMENTO SOCIALE

### SCOPI

Lo scopo di questa ricerca è stato quello di individuare i fattori di stress psico-sociale in gatti che vivono in gattile analizzando i correlati comportamentali ed ormonali dello stress in questa condizione socio-ecologica, ricercando, in particolare, l'evidenza ormonale di uno stato di stress prolungato e la messa in atto di strategie comportamentali di contenimento dello stesso.

### MATERIALI E METODI

#### AMBIENTE DI STUDIO

Per questo esperimento sono stati utilizzati gatti ospitati in un canile-gattile privato, gestito da un'associazione di volontariato.

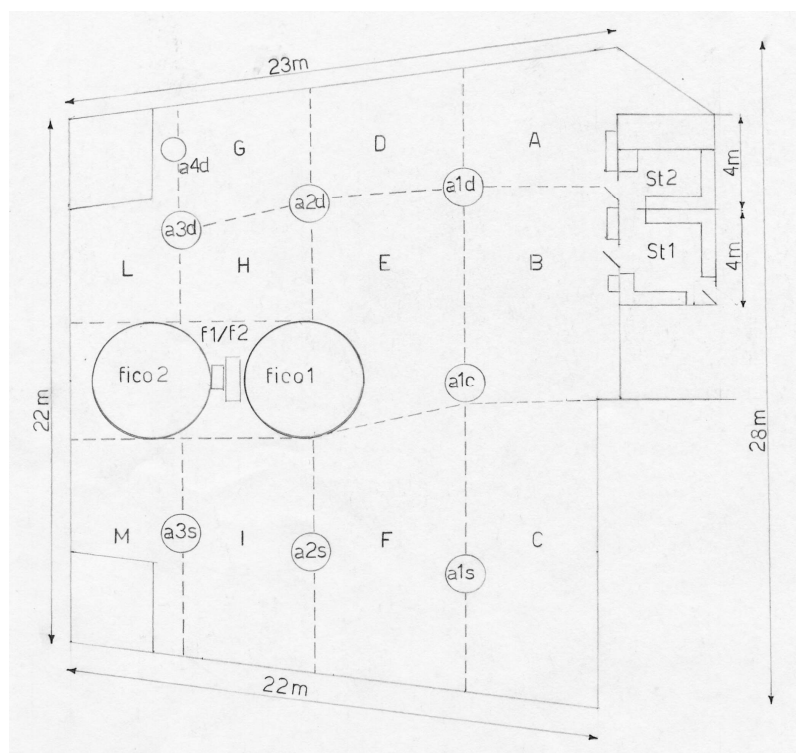
Il numero dei gatti ospitati nel gattile è di circa 100 soggetti, alloggiati in due locali chiusi (stanze) di circa 4 x 4 metri ed in un giardino di circa 23 x 28 metri, completamente recintato con una rete metallica che permette la visuale sull'adiacente strada. I locali chiusi ed il giardino sono intercomunicanti.

I locali chiusi sono attrezzati con mensole sopraelevate, cuccette in materiale plastico, cassette igieniche, distributori di cibo secco e di acqua.

Nella zona “giardino” sono presenti alberi, lettini, cassette per animali, distributori di acqua e mensole infisse sul muro esterno dello stabile.

I gatti hanno libertà di movimento all'interno dei locali e del giardino, quindi tutta l'area è completamente accessibile ai gatti e all'osservatore. La superficie complessiva a disposizione dei gatti è di circa 600 metri quadrati, ai quali si aggiungono circa 10 metri quadrati di superficie sopraelevata (mensole). La disponibilità di spazio pro-capite è quindi pari a 6,10 m<sup>2</sup>/gatto.

In figura 5 è riportata la planimetria dell'intera struttura, con indicazione delle zone arbitrariamente definite allo scopo di valutare la distribuzione spaziale dei gatti e l'utilizzo dell'area.



**Figura 5:** Planimetria del gattile. I locali chiusi sono indicati con St1 e St2 mentre il giardino è stato arbitrariamente suddiviso in 14 zone indicate con le lettere dell'alfabeto (da A a M), con fico 1, fico 2 e f1/f2. I cerchi con la scritta all'interno indicano la posizione degli alberi nel giardino.



**Figura 6:** Fotografie del giardino (destra) e di un locale chiuso (sinistra). Nella fotografia del giardino sono individuabili le zone definite fico1, fico2 e f1/f2. In quella della stanza si osservano due livelli di mensole con i distributori di cibo secco e di acqua, le cuccette e le cassette igieniche.

Il cibo, di tipo umido, viene somministrato ai gatti due volte al giorno in orari fissi (14:30 e 21:00) in ciotole, in numero pari al numero di animali, distribuite indifferentemente in giardino e nelle 2 stanze. I gatti, inoltre, hanno la possibilità di accedere liberamente, durante l'intera giornata, all'acqua di abbeverata e a cibo secco posti sia nei locali chiusi che nel giardino.

Le pulizie dei locali vengono realizzate giornalmente dalle 14:30 alle 18:00.

Il gattile è inoltre dotato di locale per le operazioni di pulizia, lavaggio e disinfezione di materiali ed attrezzature, locale di preparazione dei cibi e ambulatorio veterinario.

## SOGGETTI DELLO STUDIO

Per la ricerca sono stati utilizzati 45 gatti meticci di ambo i sessi (18 maschi - 40% - e 27 femmine - 60%) di età compresa tra 1 e 18 anni. Tutti gli individui erano sterilizzati (orchiectomia per i maschi e ovario-isterectomia per le femmine).

Gli animali scelti per la sperimentazione dovevano risultare sani alla visita clinica effettuata prima dell'inizio della sperimentazione. Questa scelta è stata fatta allo scopo di escludere i soggetti con patologie dismetaboliche, neurologiche o di altra natura che potessero alterare il comportamento del gatto.

I gatti sono stati identificati ed è stata delineata, ove e per quanto possibile, la storia pregressa di ogni individuo. Quest'ultima operazione è risultata particolarmente difficile perché, come è consuetudine presso i gattili, i gatti hanno diverse provenienze; i soggetti oggetto dello studio sono, infatti, gatti abbandonati, randagi o ceduti dai proprietari per varie ragioni.



**Figura 7:** Soggetto dello studio.

## OSSERVAZIONI COMPORTAMENTALI E METODOLOGIE DI CAMPIONAMENTO

La durata della studio è stata di 5 mesi; le osservazioni comportamentali sono state effettuate da aprile ad agosto.

I metodi di campionamento degli eventi comportamentali esibiti dai soggetti dello studio sono quelli descritti precedentemente.

*I focali* hanno avuto una durata di 10 minuti per ciascuno dei soggetti prescelti e le scansioni per l'intero gruppo sono state effettuate ogni 20 minuti.

Le osservazioni sono state svolte giornalmente fra le 16:00 e le 21:00.

L'intero studio ha previsto 61 giorni di campionamento del comportamento (uguale a 61 sessioni), per un totale di 804 campionamenti focali (pari a 190 minuti/animale per i soggetti presenti per l'intero periodo della prova) e 821 scansioni.

A causa del decesso di 6 gatti (3 maschi e 3 femmine) durante il corso dello studio, il numero totale di focali e scansioni pro-capite non è uguale per tutti i soggetti. I dati dei soggetti deceduti sono stati eliminati da tutte le analisi comportamentali, ma conservati, quando possibile, in quelle riguardanti gli ormoni.

---

## RACCOLTA E TRATTAMENTO DEL MATERIALE BIOLOGICO

All'inizio della prova ed al termine della stessa, in giornate diverse da quelle in cui i gatti sono stati sottoposti alle sessioni di osservazione, sono stati raccolti campioni di pelo.

Il pelo è stato raccolto dalla regione lombo-sacrale-coccigea mediante rasatura effettuata con forbici. Il pelo così raccolto è stato subito posto in bustine di plastica a chiusura ermetica, identificato (soggetto, data, regione anatomica di prelievo) e conservato a temperatura ambiente.

Nel corso della sperimentazione, ogni volta che ciò era possibile, sono state raccolte le feci di ciascun animale al momento dell'emissione prestando attenzione a che i campioni non fossero contaminati da altri escreti. Le feci sono state poste in sacchetti di plastica, identificati (soggetto, data, ora) ed immediatamente conservati -20°C.

Sui campioni di pelo e feci sono state valutate le concentrazioni di cortisolo.

---

## METODI DI ANALISI

La determinazione della concentrazione del cortisolo nel pelo e nelle feci è stata effettuata mediante le tecniche radioimmunologiche (RIA) descritte precedentemente.



## RISULTATI E DISCUSSIONE

### COMPORAMENTI

#### ASSOCIAZIONI FRA CATEGORIE COMPORAMENTALI

Vengono di seguito indicate solo le correlazioni risultate significative. Nell'ambito dei comportamenti campionati a scansione, sono risultate positivamente associate la categoria "attività" (esplorare, giocare, locomozione) e marcatura con  $P < 0.0002$  (ipotesi monodirezionale, nella direzione prevista). Inoltre si sono riscontrate associazioni significative, con ipotesi bidirezionale, fra inattività e indicatori comportamentali di stress-comportamenti autodiretti (correlazione negativa,  $P < 0,0001$ ), numero di scansioni fuori visuale e indicatori comportamentali di stress-comportamenti autodiretti (correlazione negativa,  $P < 0,04$ ) e fra marcatura e comportamenti affiliativi (correlazione positiva,  $P < 0,03$ ).

Nell'ambito dei comportamenti campionati a focale e con il metodo comportamentale, si è riscontrata un'associazione positiva ( $P < 0,002$ ) fra indicatori comportamentali di stress-comportamenti autodiretti e attività di mantenimento.

#### DIFFERENZE TRA FEMMINE E MASCHI

Non sono state riscontrate differenze significative fra i sessi nell'ambito dei comportamenti campionati a scansione, mentre fra quelli campionati a focale e con il metodo comportamentale è risultata diversamente ripartita l'attività di marcatura, maggiore da parte dei maschi ( $P < 0,003$ ).

### DATI ORMONALI

Sono state rilevate le concentrazioni di cortisolo nelle feci e nel pelo. Le concentrazioni medie di cortisolo rilevate nelle feci, suddivise per due sessi, sono riportate nella tabella 3.

<b>Feci</b>	<b>N° animali</b>	<b>Cortisolo (pg/mg)</b>
<b>Maschi</b>	12	$0,79 \pm 0,14$
<b>Femmine</b>	13	$0,46 \pm 0,22$
<b>Totale</b>	25	$0,62 \pm 0,14$

**Tabella 3:** Concentrazioni medie di cortisolo rilevate nelle feci suddivise per i due sessi (media  $\pm$  E.S.).



Dalla tabella si osserva che i maschi hanno presentato concentrazioni fecali di cortisolo più elevate ma non significative rispetto alle femmine.

Nella tabella 4 sono riportate le concentrazioni medie di cortisolo rilevate nel pelo dei gatti suddivisi per in base al sesso.

<b>Pelo</b>	<b>N° animali</b>	<b>Cortisolo(pg/mg)</b>
<b>Maschi</b>	12	1,15 ± 0,19
<b>Femmine</b>	13	1,31 ± 1,11
<b>Totale</b>	25	1,24 ± 0,68

**Tabella 4:** Concentrazioni medie di cortisolo rilevate nel pelo suddivise per i due sessi (media ± E.S.).

Nei maschi le concentrazioni cortisolo sono risultate inferiori rispetto a quelle delle femmine. Le differenze rilevate tra i sessi non sono risultate significative.

#### ASSOCIAZIONI FRA CATEGORIE COMPORTAMENTALI E CONCENTRAZIONI ORMONALI

Tutte le classi di comportamento sono state saggiate contro il contenuto di cortisolo nel pelo e nelle feci. Nell'ambito dei comportamenti campionati a scansione, le categorie "attività" e marcatura sono risultate negativamente associate con il cortisolo nel pelo (ipotesi monodirezionale:  $P < 0,01$  e  $P < 0,04$  rispettivamente). Non si sono riscontrate correlazioni significative con le concentrazioni fecali.

Nell'ambito dei comportamenti campionati a focale e con il metodo comportamentale, è stata riscontrata una correlazione negativa fra marcatura e cortisolo pilifero ( $P < 0,05$ ). Tutte le ipotesi erano monodirezionali e confermate dal risultato dei test.

E' stata inoltre trovata una correlazione negativa non significativa, ma nella direzione prevista, fra il numero di comportamenti affiliativi dati e ricevuti e il contenuto di cortisolo nel pelo.

Appare evidente, dunque, una chiara correlazione negativa fra attività di marcatura e contenuto di cortisolo nel pelo. Sia il livello generale di attività, sia i comportamenti affiliativi dati e ricevuti sono positivamente associati all'attività di marcatura ed, inoltre, il primo è ugualmente e significativamente associato negativamente al cortisolo, mentre i secondi lo sono in modo non significativo. La relazione fra queste ultime due classi di

comportamenti e l'indicatore ormonale di stress potrebbe essere diretta come dovuta alla loro associazione con l'attività di marcatura.

## ESPERIMENTO 2 – EFFETTI DELLE POSTAZIONI DI MARCATURA SULLO STRESS

### SCOPI

Scopo di questa ricerca è stato quello di approfondire il ruolo della marcatura visivo-feromonale in gatti che vivono in gattile, in condizioni di alta densità.

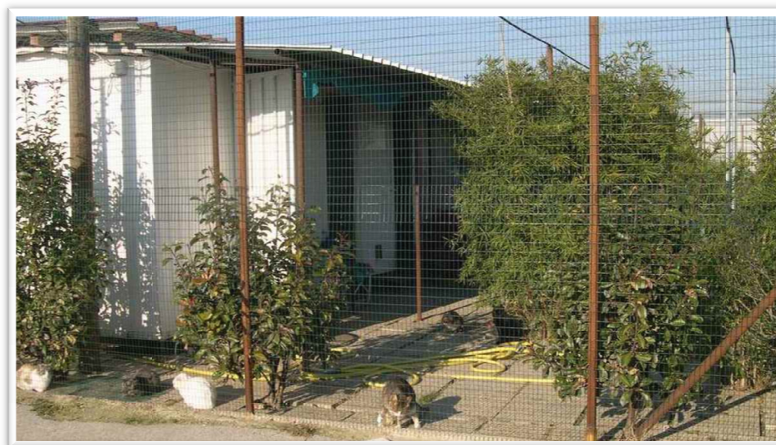
### MATERIALI E METODI

#### AMBIENTE DI STUDIO

Lo studio è stato condotto presso un gattile privato, gestito da un'associazione di volontari.

Il gattile ha una superficie complessiva di 160,56 m<sup>2</sup>, pari a 16,30 metri di lunghezza x 9,85 metri di larghezza. La struttura è interamente recintata con una rete metallica a maglie rettangolari e romboidali e superiormente chiuso da una rete metallica a maglie esagonali che impedisce ai gatti di uscire dalla struttura, ma permette loro la visuale degli ambienti circostanti.

Il numero dei gatti ospitati all'interno della struttura è di circa 40: questo dato, tuttavia, può variare in relazione al frequente ricambio dovuto soprattutto alle numerose adozioni.



**Figura 8:** Gattile in cui è stato condotto lo studio.

Il gattile (figura8) è costituito da 3 aree separate per mezzo di reti metalliche a maglie rettangolari: area “infermeria”, area “quarantena” e area “residenti”. Quest’ultima è stata scelta come area di studio.

Nell' area residenti sono presenti locali chiusi: un container suddiviso in 2 ambienti distinti, adibiti a casette per il riparo dei gatti, e un box metallico, utilizzato come magazzino, il cui accesso è impedito ai gatti.

Le 2 casette hanno rispettivamente dimensioni di 2,55 x 2,40 m e 2,65 x 2,40 m e contengono: mensole, recipienti in plastica contenenti lettiera in trucioli, ciotole per l'acqua e per il cibo, cassapanche e un divano.

Oltre alle due casette, nell'area residenti, i gatti hanno a disposizione una superficie all'aperto, completamente pavimentata con piastrelle in cemento (50 cm x 50 cm), in cui si trovano: una lettiera in muratura (figura 9), coperta da una tettoia metallica, contenente trucioli, una panchina, un tavolino, piante/arbusti, tronchi stesi sul pavimento, una struttura in legno a due piani, simile ad una scaletta, cucce in legno, sedie, poltrone, lettini e cuccette in materiale plastico (che vengono periodicamente sostituite a seconda dell'usura) e ciotole per acqua e cibo, sparse sul pavimento.



**Figura 9:** Lettiera in muratura.



Figura 10: Particolare dell'ambiente esterno (sx) e dell'interno della seconda casetta (dx).

Le operazioni di pulizia dei locali, delle ciotole e delle lettieri e quelle di distribuzione del cibo sono svolte giornalmente ed esclusivamente dai volontari dell'associazione, di solito in mattinata (dalle ore 10:00 alle ore 13:30).

Il cibo, di tipo umido e secco, viene somministrato una volta al giorno (verso le ore 12:30) in ciotole distribuite sia nelle casette che all'esterno.

In figura 11 è riportata la planimetria del gattile, nella quale sono stati volutamente omessi i particolari strutturali relativi alle aree quarantena ed infermeria, visto che i gatti in esse ospitati sono stati esclusi dallo studio.

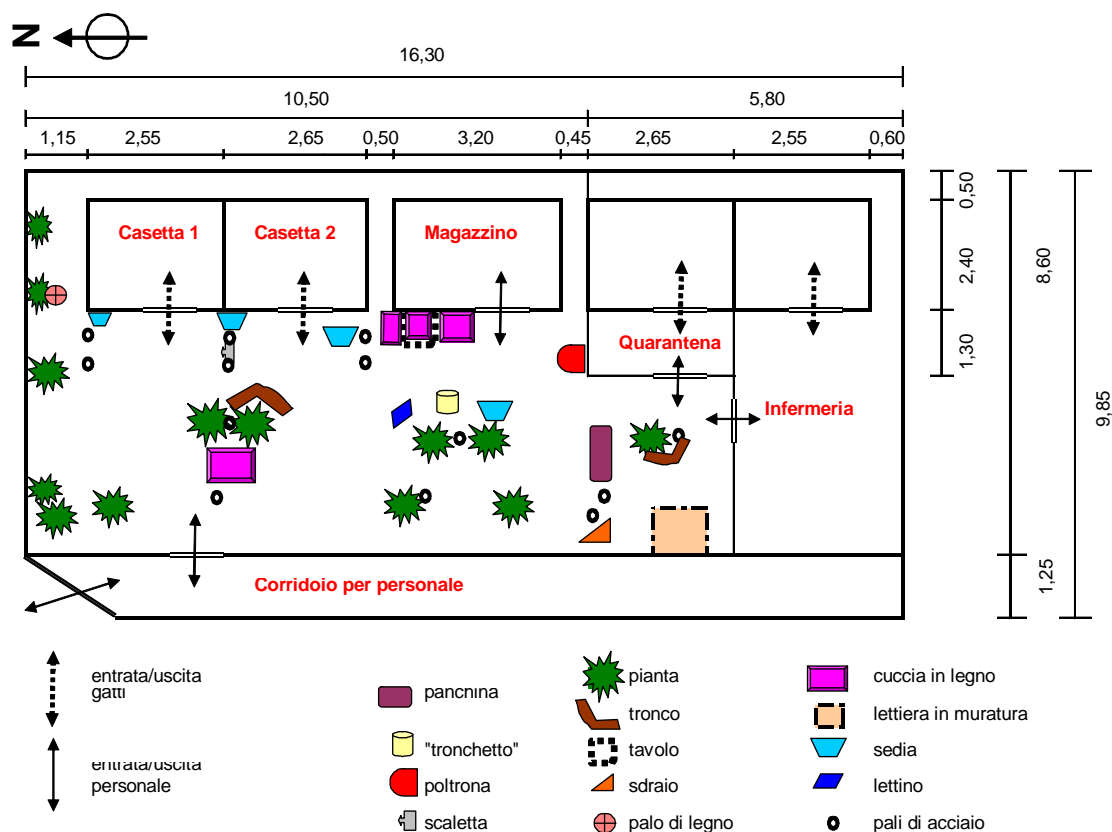


Figura 11: Planimetria del gattile.

La superficie complessiva a disposizione dei gatti nell'area residenti -area di studio- è pari a 94,28 mq. La disponibilità di spazio procapite è stata calcolata sulla media delle presenze nel primo e nel secondo periodo di osservazioni, in considerazione del fatto che nel corso dello studio il numero dei soggetti ha subito molteplici variazioni; lo spazio procapite è stato per il primo periodo di 2,24 m<sup>2</sup>, mentre per il secondo di 2,65 m<sup>2</sup>.

#### SOGGETTI DELLO STUDIO

Per lo studio sono stati campionati 52 gatti meticci di ambo i sessi (16 maschi – 31% e 36 femmine – 69%) di età stimata compresa tra 1 e 13 anni, sterilizzati (orchietomia per i maschi, ovario-isterectomia o ovariectomia per le femmine).

Tutti i soggetti sono stati identificati; è stato impossibile nella maggior parte dei casi stabilirne età e storia pregressa, dal momento che presso il gattile confluiscono gatti di diversa provenienza, ossia abbandonati, randagi o ceduti dai proprietari per varie ragioni.

I gatti scelti per la ricerca erano sani alla visita clinica eseguita prima dell'inizio delle osservazioni comportamentali; questo allo scopo di escludere quei soggetti con patologie neurologiche, dismetaboliche o di altra natura che potessero alterare il loro comportamento o i risultati relativi alle analisi ormonali.



**Figura 12:** Soggetto dello studio.

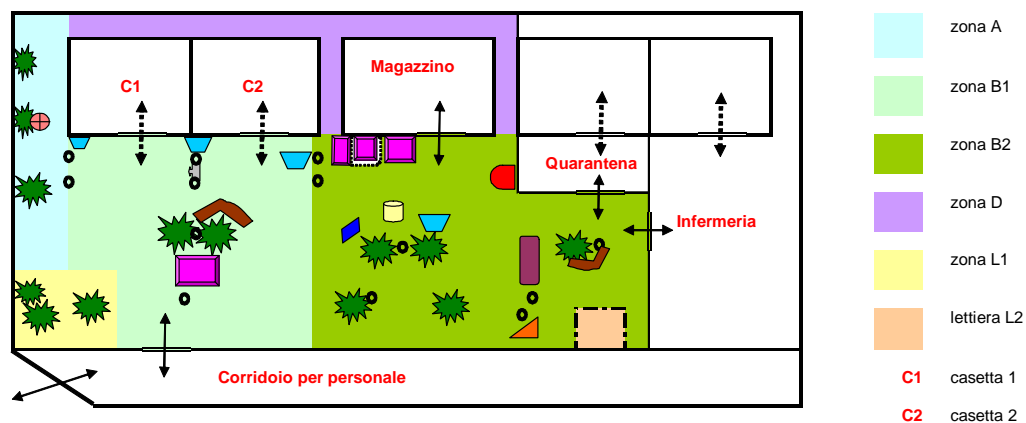
## DISEGNO SPERIMENTALE

La durata dello studio è stata di 6 mesi. Le osservazioni comportamentali sono state effettuate da giugno a novembre.

Lo studio è stato suddiviso in 2 periodi:

- primo periodo (P1) che ha previsto un totale di 69 giornate di campionamento,
- secondo periodo (P2) che ha previsto un totale di 55 giornate di campionamento.

L'intera superficie dell'area residenti, per facilitare la raccolta e la successiva analisi dei dati, è stata arbitrariamente suddivisa in 5 zone: A, B1, B2, D e L1. Le casette sono state denominate C1 e C2; la lettiera in muratura esterna è stata chiamata L2 (figura 13).



**Figura 13:** Suddivisione dell'area di studio in zone.

All'inizio del primo periodo di osservazioni sono stati introdotti nel gattile 4 postazioni di marcatura per graffiatura e 2 postazioni di marcatura per strofinamento (che nella successiva descrizione saranno chiamate, per comodità di linguaggio, rispettivamente “graffiatoi” e “spazzole”). Tali postazioni di marcatura sono prodotti disponibili sul mercato (*Camon S.r.l* per i graffiatoi e *Karlie Kratzecke* per le spazzole): entrambi i dispositivi sono aromatizzati con catnip polverizzato. Tale prodotto è estratto dalle foglie e dalle radici di *Nepeta cataria*, le quali contengono un olio volatile complesso, il *cis-trans-nepetalactone-monoterpene*, che assomiglia ad un feromone rinvenuto nell'urina del gatto maschio. Il catnip ha un comprovato potere attrattivo per i gatti selvatici e domestici, così come per altri felidi (Clapperton *et al.*, 1994; McElvain *et al.*, 1941; Sakan *et al.*, 1965; Sakurai *et al.*,



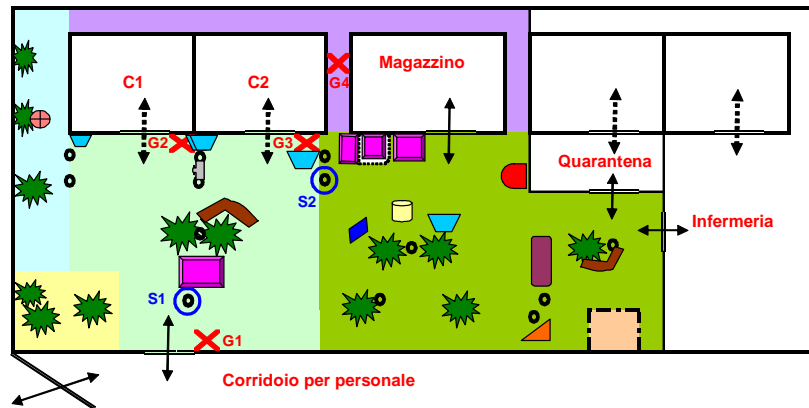
1988; Tucker & Tucker, 1988). E' stato dimostrato che non tutti i gatti rispondono con la stessa intensità al catnip e che la risposta che esso evoca è geneticamente ereditata, mediante un gene autosomico dominante (Todd, 1962). In questi prodotti commerciali, tuttavia, il catnip ha la sola funzione di attrarre inizialmente i gatti, i quali reagiscono immediatamente a tale richiamo, graffiando e strofinandosi su questi oggetti; nel tempo, a seguito della progressiva diminuzione dell'odore del catnip, l'odore del gatto stesso diventa il reale attraente. Sono state effettuate prove con postazioni di marcatura (graffiatoi e spazzole) inodori, presentate a gatti che in precedenza ne avevano usate altre aromatizzate con catnip; esse hanno dimostrato che il catnip facilitava l'approccio e la successiva marcatura, ma solo come reazione iniziale (Carloni E., dati non pubblicati). Tuttavia, non si può escludere la possibilità dell'esistenza di una risposta endocrina e/o comportamentale al catnip.

I graffiatoi, cilindri di cartone ondulato pressato, sono stati posizionati, compatibilmente allo spazio disponibile, 3 in orizzontale, stesi sulla superficie pavimentata esterna, e 1 in verticale, appoggiato alla parete esterna della prima casetta. Tali graffiatoi, rispettivamente denominati G1, G2, G3 e G4, sono stati sostituiti 10 volte nel corso del primo periodo di osservazioni a seconda dell'usura, dovuta sia alle condizioni ambientali, che all'utilizzo che di essi ne facevano i gatti. Sono stati utilizzati quindi un totale di 14 graffiatoi per l'intera durata della prima fase di studio.

Le spazzole utilizzate (denominate S1 e S2) sono costituite da piastre di materiale plastico con superficie dentellata e dotate di un piccolo scomparto contenente una bustina di polvere di catnip; sono state legate a pali all'altezza di circa 15 cm da terra in modo da consentirne il facile utilizzo da parte dei gatti. Per quanto riguarda le spazzole non è stato necessario sostituirle, in conseguenza del fatto che il materiale plastico non si è alterato nel corso del tempo.

La posizione dei graffiatoi e delle spazzole viene indicata nella figura di seguito riportata.





**Figura 14:** Posizione dei graffiatoi e delle spazzole nell'area di studio (con O sono indicate le spazzole e con x i graffiatoi).



**Figura 15:** Immagine di un graffiatoio (sx) e di una spazzola (dx).

Alla fine del primo periodo i graffiatoi e le spazzole sono stati rimossi. Solo in questo momento ha avuto inizio la seconda fase dello studio.

## OSSERVAZIONI COMPORTAMENTALI E METODOLOGIE DI CAMPIONAMENTO

Per il campionamento degli eventi comportamentali esibiti dai soggetti dello studio sono stati utilizzati i metodi descritti precedentemente.

Le osservazioni sono state organizzate in blocchi di focali (20 minuti per ciascun soggetto) e scansioni consecutive, che seguivano quotidianamente, per quanto possibile, i seguenti orari: 09:00-12:00, 16:30-21:00 nel primo periodo dello studio, 09:00-12:30, 14:30-18:00 nel secondo periodo in conseguenza dell'accorciamento delle giornate.

Nel secondo periodo dello studio, gli orari in cui sono state eseguite le osservazioni per ciascun soggetto venivano scelti cercando, il più possibile, di rispettare gli orari del primo periodo, tenendo conto, ovviamente, del cambiamento climatico e della minore lunghezza delle giornate.

L'intero studio ha previsto 69 giornate di campionamento nel primo periodo e 55 giornate di campionamento nel secondo periodo, per un totale di 18 semifocali (pari a 360 minuti/animale), suddivisi in 9 focali per ciascun individuo nel primo periodo e altri 9 nel secondo periodo e 873 scansioni per i soggetti presenti per l'intero studio.

Nel corso dello studio si sono verificati numerosi cambiamenti nell'ambito del gruppo inizialmente scelto, composto da 38 individui.

Durante il primo periodo:

- 11 nuovi soggetti sono entrati a far parte del gruppo di studio: di questi 11, nel corso del primo periodo stesso, 5 sono stati adottati, 1 è stato spostato nell'area infermeria, 2 sono deceduti;
- 2 soggetti, appartenenti al gruppo iniziale, sono stati adottati.

Nel corso del secondo periodo:

- 3 nuovi soggetti sono entrati nel gruppo di studio: 2 di questi sono stati adottati durante lo stesso periodo;
- 6 sono stati adottati (di cui 2 appartenenti al gruppo degli 11 soggetti entrati nel primo periodo ed i restanti 4 presenti all'inizio della sperimentazione),
- 2, appartenenti al gruppo iniziale, sono stati spostati nell'area infermeria.

E' stato stabilito che le osservazioni comportamentali dei soggetti, per i quali si prevedeva una permanenza al gattile di breve durata, fossero limitate alle sole scansioni.

Per tutti questi motivi il numero totale di focali e scansioni procapite non è uguale per tutti i soggetti.

## RACCOLTA E TRATTAMENTO DEL MATERIALE BIOLOGICO

Durante lo studio, in giornate diverse da quelle in cui venivano eseguite le osservazioni comportamentali, sono stati raccolti campioni di pelo.

- Sono stati effettuati un totale di 3 prelievi così ripartiti:
- 1° prelievo: prima dell'introduzione di graffiatoi e spazzole e prima dell'inizio delle osservazioni;

- 2° prelievo: al termine del primo periodo di osservazioni e prima dell'inizio del secondo, subito dopo la rimozione di spazzole e graffiatoi;
- 3° prelievo: alla fine del secondo periodo di osservazioni.

I 3 prelievi sono stati effettuati solo sui soggetti che si mostravano collaborativi al prelievo stesso. Per alcuni soggetti è stato infatti impossibile effettuare il prelievo dal momento che non si lasciavano avvicinare.

Il pelo è stato raccolto dalla regione lombo-ischiatica o dalla regione nucale, mediante rasatura effettuata con forbici. Il pelo così raccolto è stato subito posto in bustine di plastica a chiusura ermetica, identificato (soggetto, data, regione anatomica di prelievo) e conservato a temperatura ambiente. I 3 prelievi sono stati effettuati sempre nella stessa regione anatomica.

Nel corso della sperimentazione, ogni volta che ciò era possibile, sono state raccolte le feci di ciascun soggetto al momento dell'emissione, prestando attenzione a che i campioni non fossero contaminati da altri escreti. Le feci sono state poste in sacchetti di plastica, identificate (soggetto, data, ora) e immediatamente conservate a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Sui campioni di pelo e feci sono state valutate le concentrazioni di cortisolo.

---

## METODI DI ANALISI

La determinazione della concentrazione del cortisolo è stata effettuata mediante le tecniche radioimmunologiche (RIA) precedentemente descritte.

---

## ANALISI STATISTICA

Per l'analisi statistica, oltre ai test descritti precedentemente sono stati utilizzati anche:

- Il test di Wilcoxon per confrontare i campioni appaiati, ossia i valori dei singoli individui nel primo e nel secondo periodo sperimentale.
- Il test di Friedman ANOVA associato al coefficiente di concordanza di Kendall per confrontare le concentrazioni ormonali presenti nel pelo nelle tre sessioni di campionatura.

Il livello di significatività  $P$  è stato posto, a priori, uguale a 0,05.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### COMPORTAMENTO

#### SCANSIONI

Dal momento che il numero di campionamenti a scansione, eseguiti nei due periodi di studio, non è stato il medesimo, è stato necessario, al fine di poter confrontare i comportamenti campionati nei due periodi, trasformare il numero dei record a scansione. Questo si è ottenuto dividendo i totali individuali di ciascun comportamento per il numero di scansioni effettuate: 473 nel primo, 400 nel secondo periodo.

Il test di Wilcoxon a campioni appaiati, pertanto, è stato condotto su valori medi. Il numero di gatti confrontati con il test di Wilcoxon, nei due periodi, è stato pari a 29. Si sono trovate differenze significative tra i comportamenti campionati nei due periodi sperimentali.

In particolare, si è registrato un aumento nella frequenza di:

- inattività semplice ( $P=0,000006$ , ipotesi bidirezionale - ip.bidir.), (grafico 4);
- scrollarsi + *skin roll* + comportamento orale ( $P=0,000049$ , ipotesi monodirezionale - ip.monodir.) (grafico 5);
- comportamenti autodiretti ( $P=0,000008$ , ip.monodir.) (grafico 6);
- la somma di questi ultimi, cioè la categoria globale dei comportamenti legati allo stress ( $P=0,0000025$ , ip.monodir.).

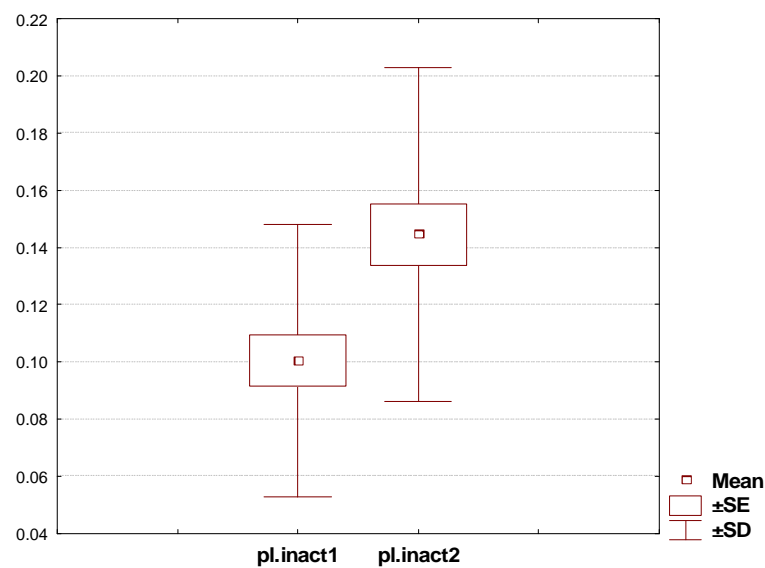
Risultavano invece diminuiti:

- il riposo ( $P=0,0005$ , ip.bidir.) e in particolare il riposo confidente, cioè in posture che denotano fiducia ( $P=0,0036$ , ip.monodir.);
- l'esplorazione-ispezione olfattiva ( $P=0,029$ , ip.bidir.) (grafico 7);
- lo stare in all'erta ( $P=0,0015$ , ip.bidir.) e lo stato di vigilanza generale ( $P=0,0024$ , ip.bidir.).

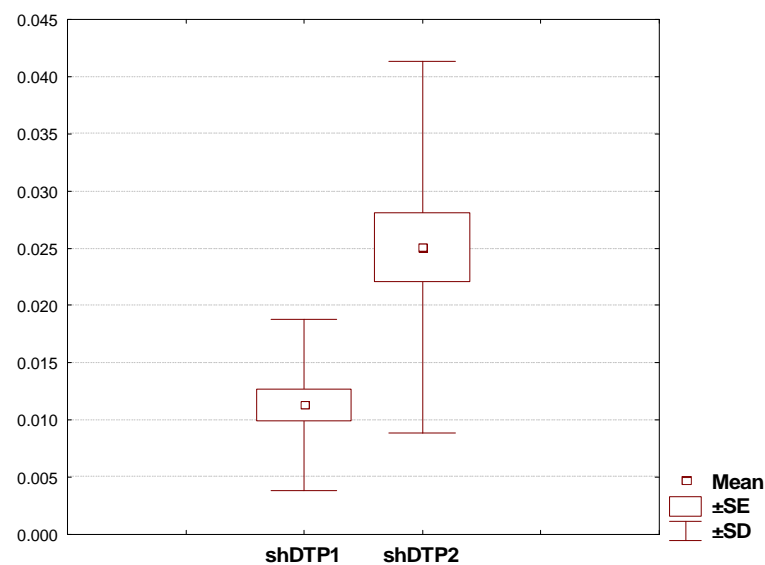
La diminuzione nei comportamenti agonistici ( $P=0,044$ , ip.bidir.) è probabilmente dovuta alla diminuzione nel numero di gatti presenti in gattile; quella registrata nelle attività di mantenimento ( $P=0,000003$ , ip.bidir.) è dovuta ad una reale diminuzione nel numero di evacuazioni diurne.

Se per il riposo fiducioso è probabile l'influenza della temperatura ambientale (l'autunno più fresco dell'estate gioca a sfavore del riposo a pancia all'aria), questa certamente non può essere invocata per le altre classi comportamentali esaminate.

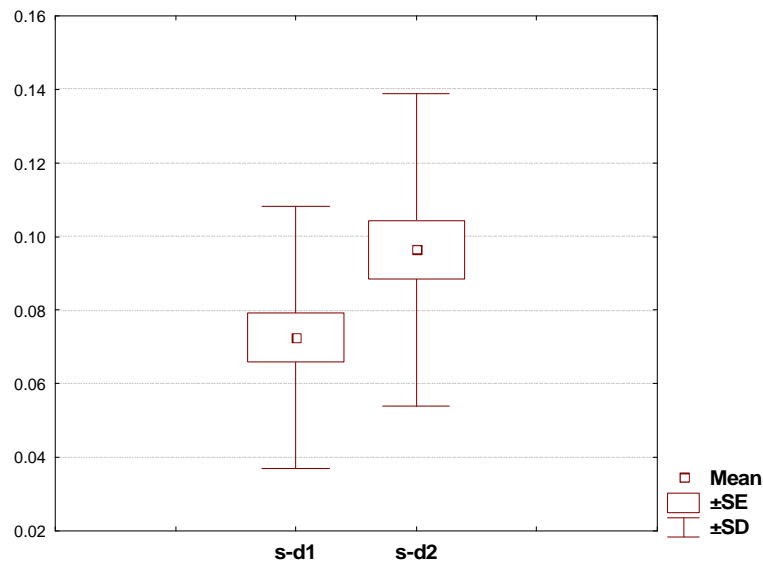
Nei grafici “*box and whiskers*” seguenti sono rappresentate le differenze nell'incidenza dei comportamenti campionati a scansione, nel primo (1) e nel secondo periodo (2); in ordinata sono mostrati i valori medi (*Mean*)  $\pm$  la deviazione standard (SD) e  $\pm$  l'errore standard (SE).



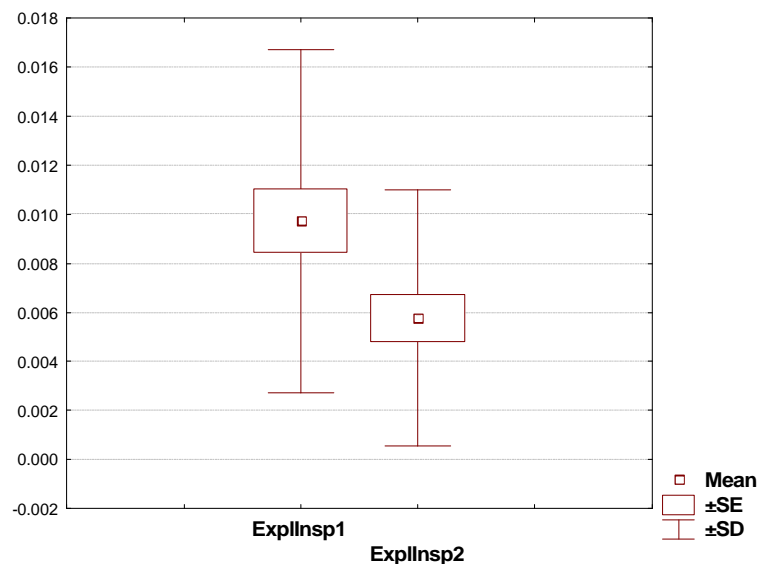
**Grafico 4:** Inattività semplice.



**Grafico 5:** Scrollarsi + *skin roll* + comportamento orale.



**Grafico 6:** Comportamenti autodiretti.



**Grafico 7:** Esplorazione-ispezione olfattiva.

#### *DIFFERENZE COMPORTAMENTALI NEI MASCHI E NELLE FEMMINE*

Le differenze sessuali trovate nel primo periodo, tra 26 femmine e 9 maschi, sono state numericamente maggiori di quelle trovate nel secondo periodo, tra 21 femmine e 8 maschi. In parte nel primo periodo, le femmine erano in media più inattive dei maschi ( $P=0,0023$ ) (grafico 8); esse riposavano in posture difensive più spesso dei maschi ( $P=0,0037$ ). Nello stesso tempo le femmine erano meno attive dei maschi ( $P=0,05$ ).

Sempre durante il primo periodo, le femmine esploravano l'ambiente meno dei maschi ( $P=0,05$ ) e marcavano di meno ( $P=0,008$ ) (grafico 9). La minor frequenza di marcatura è imputabile soprattutto alla marcatura tramite spruzzo d'urina ( $P=0,000001$ ). Inoltre, hanno mostrato una minor frequenza di comportamenti legati allo stress ( $P=0,04$  per la somma di tutti i *markers* comportamentali di stress;  $P=0,05$  per lo scrollare capo-corpo-arto addizionato di comportamento orale e *skin roll*;  $P=0,019$  per il grattarsi) (grafico 10). Compivano anche un minor numero di attività di mantenimento.

Nel secondo periodo, solo la marcatura ( $P=0,017$ ) (grafico 11) ed, in particolare, quella attuata tramite urina ( $P=0,000014$ ) è rimasta significativamente minore nelle femmine.

Nei grafici “*box and whiskers*” seguenti sono rappresentate le differenze nell’incidenza dei comportamenti campionati a scansione fra le femmine (F) e i maschi (M); in ordinata sono mostrati i valori mediani (*Median*), i valori compresi tra il primo e il terzo quartile (25% - 75%) ed i valori minimo (Min) e massimo (Max).

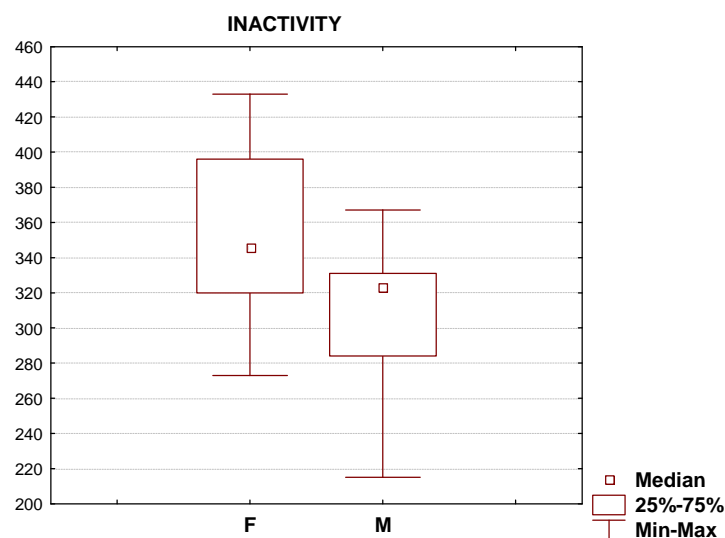
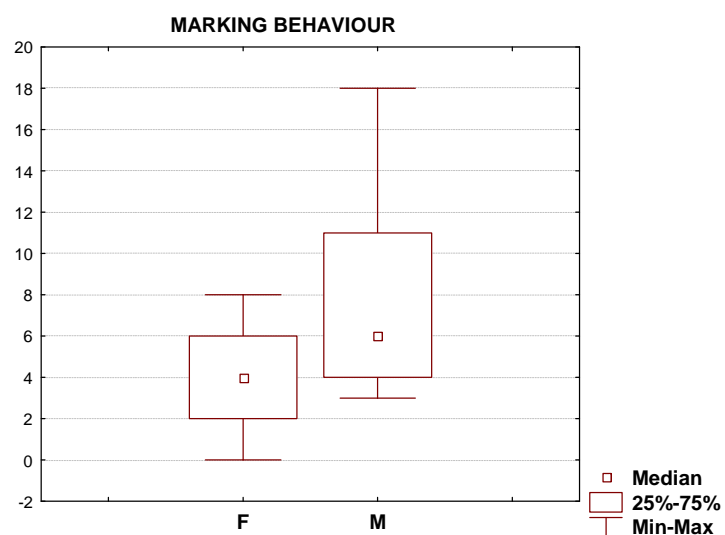
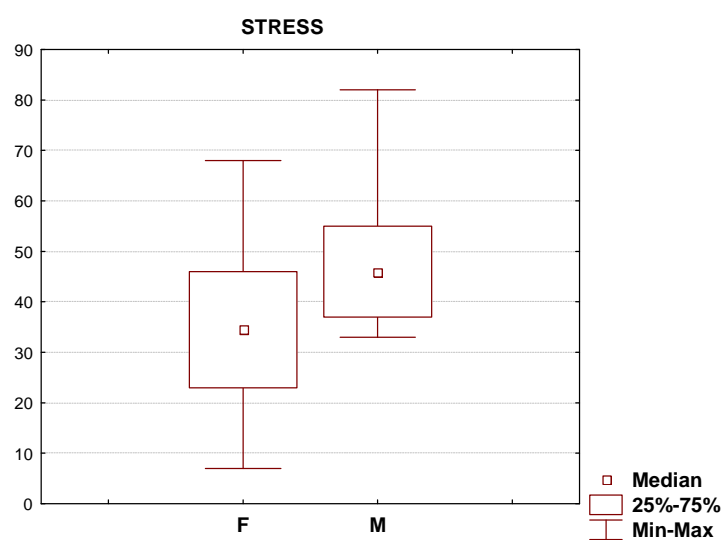


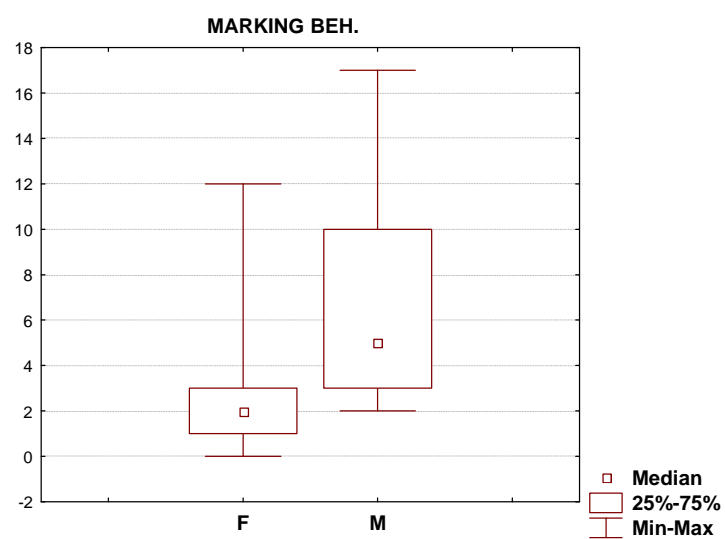
Grafico 8: Inattività I periodo.



**Grafico 9:** Marcatura I periodo.



**Grafico 10:** Markers comportamentali di stress I periodo.



**Grafico 11:** Marcatura II periodo



## FOCALI

---

Sono stati eseguiti 9 focali nel primo e 9 nel secondo periodo. In questo caso, quindi, sono state utilizzate le occorrenze totali di ogni comportamento (o categoria comportamentale). Il numero di gatti confrontati mediante il test di Wilcoxon è stato pari a 31.

Si sono trovate, anche in questo caso, differenze significative tra i comportamenti campionati a focale nei due periodi sperimentali.

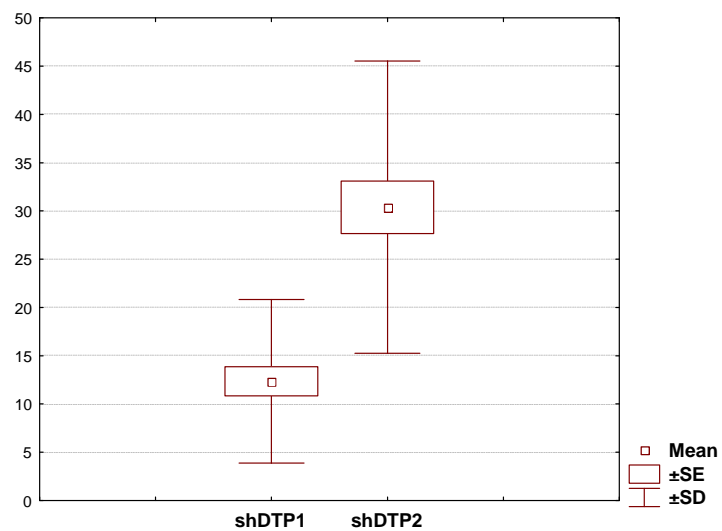
In particolare si è verificato un aumento nella frequenza di:

- scrollare la testa ( $P=0,00022$ , ip.monodir.);
- scrollarsi + *skin roll* + comportamento orale ( $P=0.000095$ , ip.monodir.) (grafico 12);
- scrollarsi + *skin roll* + comportamento orale + grattarsi ( $P=0,000065$ , ip.monodir.);
- comportamenti autodiretti ( $P=0,0188905$ , ip.monodir.) (grafico 13);
- comportamenti di esitamento + sottomissivi ( $P=0,001375$ , ip.monodir.);
- *markers* comportamentali di stress ( $P=0,0000835$ , ip.monodir.).

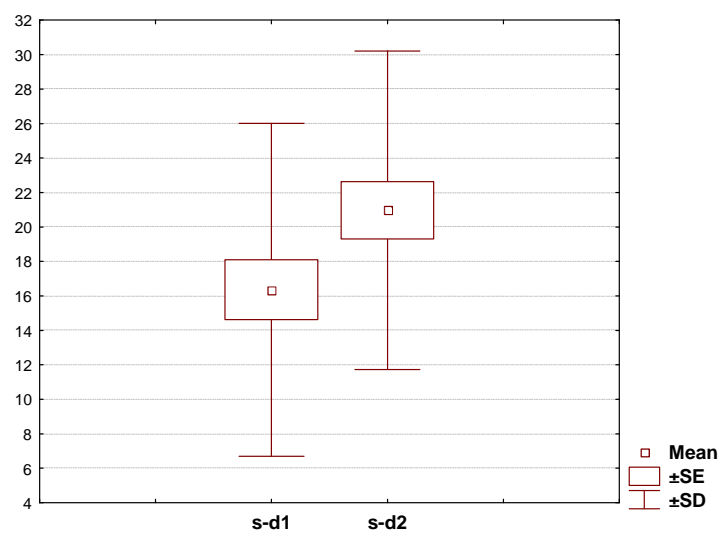
Inoltre sono aumentati i comportamenti di:

- marcatura facciale ( $P=0,017379$ , ip.bidir.);
- marcatura per strofinamento ( $P=0,022809$ , ip.bidir.);
- marcatura effettuata con le zampe anteriori e con quelle posteriori ( $P=0,039789$ , ip.monodir.);
- marcatura globale ( $P=0,011501$ , ip.bidir.) (grafico 14).

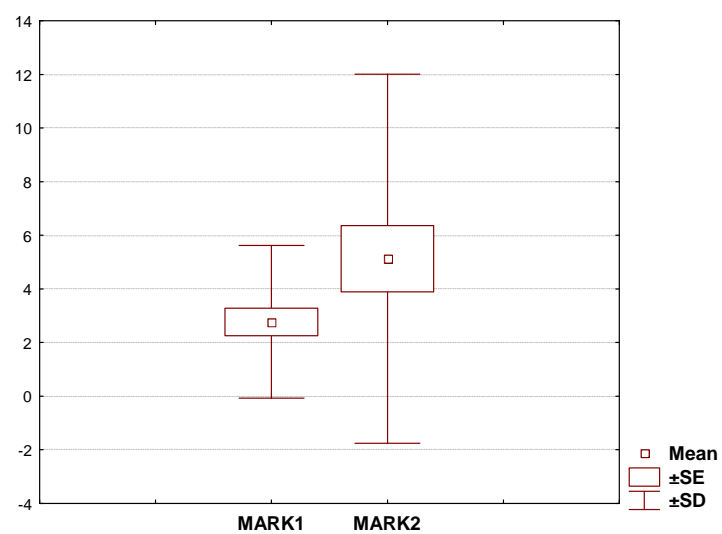
Nei grafici “*box and whiskers*” seguenti sono rappresentate le differenze tra le occorrenze totali dei comportamenti campionati a focale, nel primo (1) e secondo (2) periodo; in ordinata sono mostrati i valori medi (*Mean*)  $\pm$  la deviazione standard (SD) e  $\pm$  l'errore standard (SE).



**Grafico 12:** Scrollarsi + *skin roll* + comportamento orale.



**Grafico 13:** Comportamenti autodiretti.



**Grafico 14:** Marcatura globale.

## CAMPIONAMENTO COMPORTAMENTALE

In questo caso si è verificato un aumento nella frequenza di:

- *skin roll* ( $p=0,0000975$ , ip.monodir.);
- scrollare la testa ( $p=0,0000035$ , ip.monodir.);
- scrollare la zampa ( $p=0,0015115$ , ip.monodir.);
- grattarsi ( $p=0,026187$ , ip.monodir.);
- scrollarsi + *skin roll* + comportamento orale ( $p=0,00003$ , ip.monodir.);
- scrollarsi + *skin roll* + comportamento orale + grattarsi ( $p=0,000024$ , ip.monodir.);
- comportamenti autodiretti ( $p=0,035704$ , ip.monodir.);
- *markers* comportamentali di stress ( $p=0,000024$ , ip.monodir.) (grafico 15);
- comportamenti di evitamento ( $p=0,0084015$ , ip.monodir.) (grafico 16).

Sono invece diminuiti:

- i comportamenti di ispezione olfattiva ( $p=0,0000685$ , ip.monodir) (grafico 17);
- i comportamenti agonistici ( $p=0,017898$ , ip.bidir.) (grafico 18);
- i comportamenti di benessere ( $p=0,004455$  ip.monodir.) (grafico 19);
- i comportamenti affiliativi (contatto naso-naso, *social roll* affiliativo, *allogroom*, gioco sociale) ( $p=0,0219385$ , ip.monodir.).

Non si sono verificati cambiamenti significativi per i seguenti comportamenti:

- marcatura facciale, marcatura per strofinamento, marcatura effettuata con le zampe anteriori e con quelle posteriori e marcatura globale;
- marcatura sociale per strofinamento;
- tutti i comportamenti affiliativi e paraffiliativi sommati.

Nei grafici “*box and whiskers*” seguenti sono rappresentate le differenze tra le occorrenze totali dei comportamenti campionati a semifocale, nel primo (1) e secondo (2) periodo; in ordinata sono mostrati i valori medi (*Mean*)  $\pm$  la deviazione standard (SD) e  $\pm$  l’errore standard (SE).

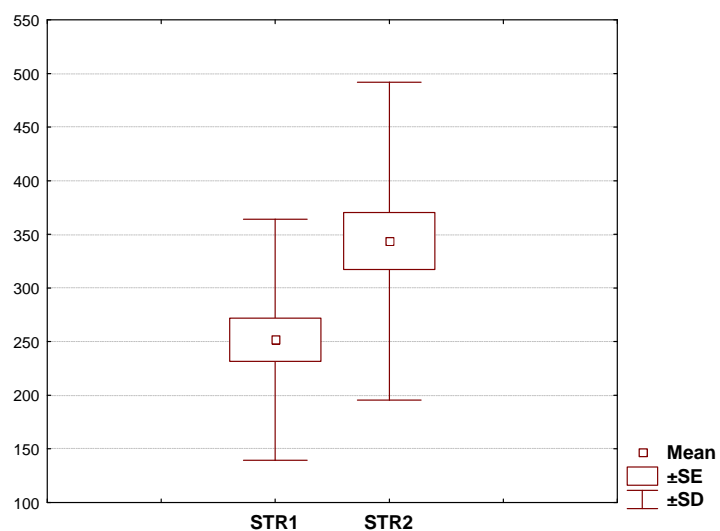


Grafico 15: Markers comportamentali di stress.

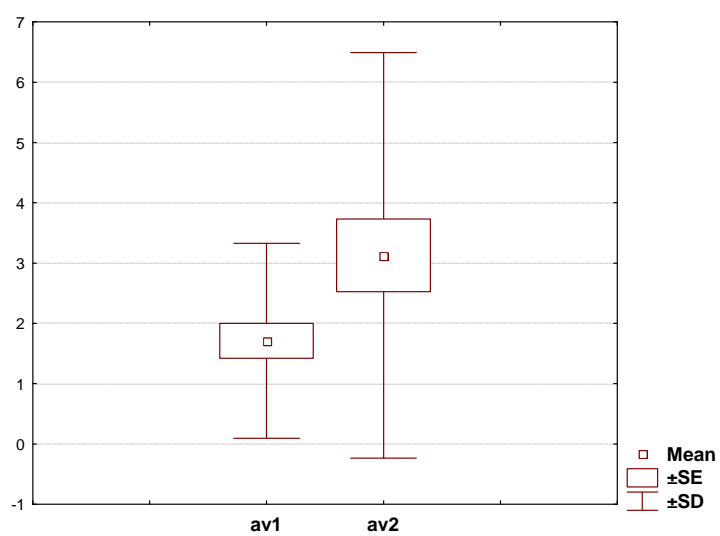


Grafico 16: Comportamenti di evitamento.

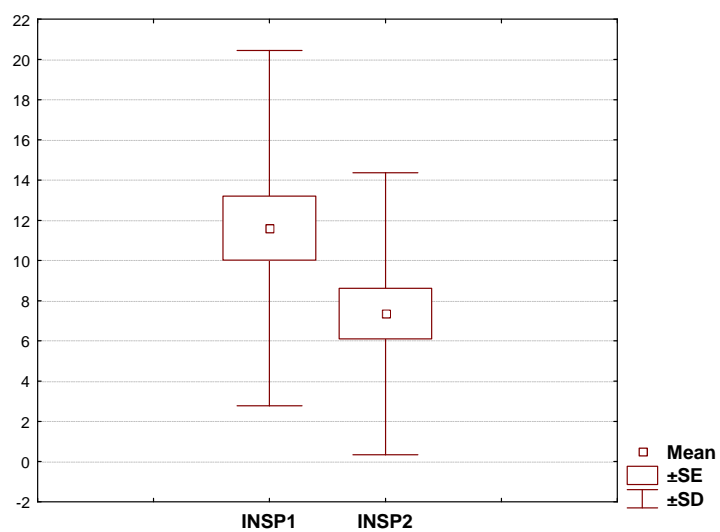
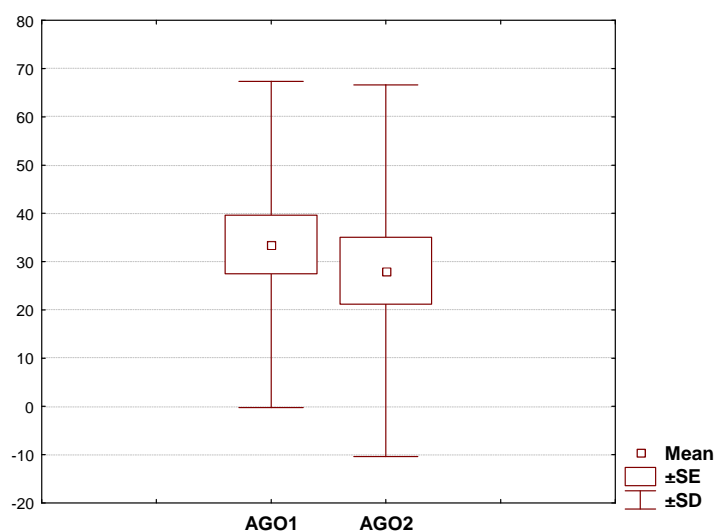
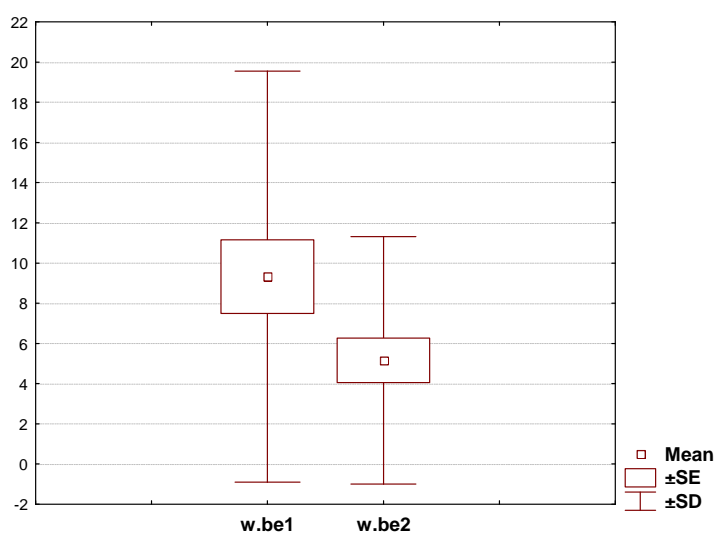


Grafico 17: Comportamenti di ispezione olfattiva.



**Grafico 18:** Comportamenti agonistici



**Grafico 19:** Comportamenti di benessere

## DATI ORMONALI

Sono stati raccolti 243 campioni di feci di 41 gatti durante il primo periodo di studio e 126 di 35 gatti durante il secondo. Inoltre, sono stati raccolti un totale di 131 campioni di pelo durante tre sessioni di campionamento.

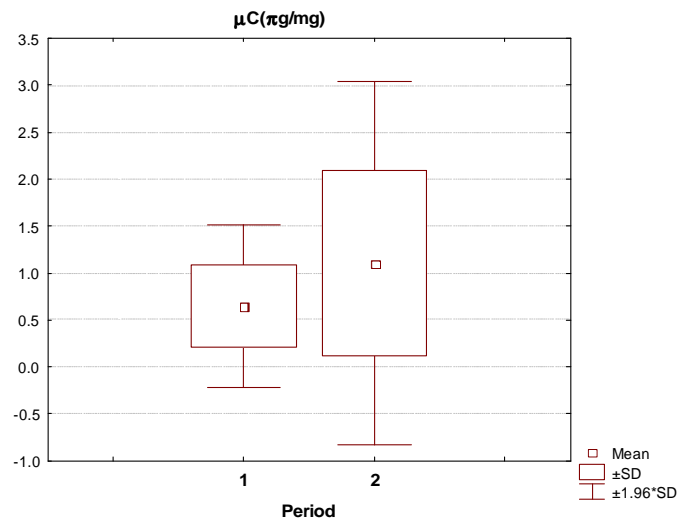
### CORTISOLO FECALE

#### DIFFERENZE TRA MASCHI E FEMMINE

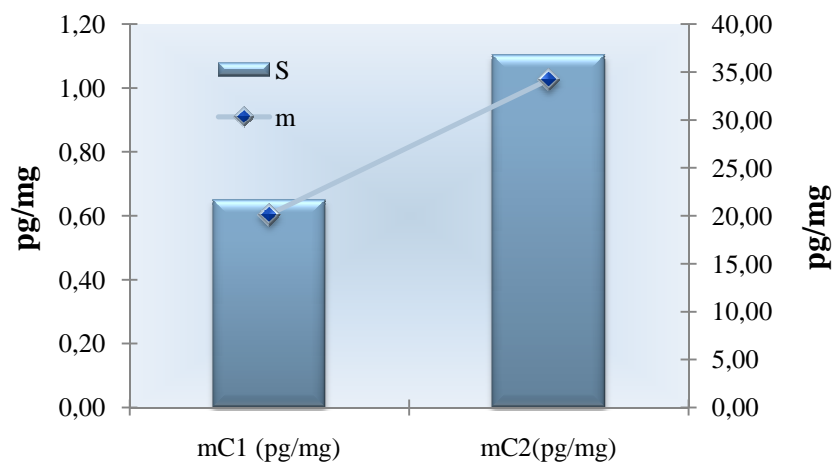
Non sono state osservate differenze significative in relazione al sesso degli animali.

### DIFFERENZE FRA IL PRIMO E IL SECONDO PERIODO SPERIMENTALE

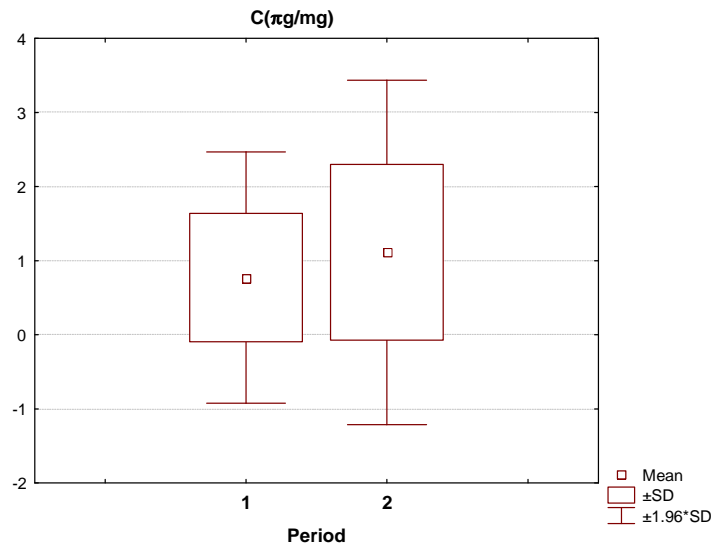
Il numero di gatti che hanno contribuito con campioni fecali ad entrambi i periodi è pari a 31, 22 femmine e 9 maschi. I sessi, in questo campione, non differiscono nei valori medi del cortisolo durante entrambi i periodi. Va sottolineato che solo i valori medi individuali sono stati saggiati. Non sono state rilevate differenze significative anche nel numero medio di campioni fecali per gatto durante i due periodi. Il test U di Mann-Whithney è stato applicato in tutti i casi. Il confronto fra le due fasi sperimentali è stato eseguito applicando il test a campioni appaiati di Wilcoxon. Tutti i risultati, i test statistici e le rappresentazioni grafiche sono mostrati dal grafico 20 al grafico 22.



**Grafico 20:** Differenze nei valori di cortisolo fecale dell'intero gruppo tra I e II periodo.



**Grafico 21:** Concentrazione media (♦) e totale (barra) di cortisolo fecale nel I e II periodo.



**Grafico 22:** Concentrazione media di cortisolo fecale nel gruppo nel I e II periodo.

Nel complesso i valori del cortisolo fecale sono aumentati nel tempo. Questo andamento è coerente con l'ipotesi sperimentale.

### *CORTISOLO NEL PELO*

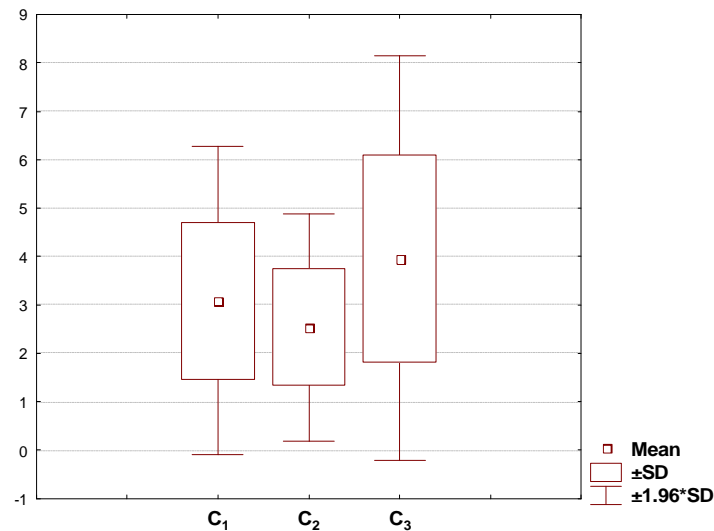
Non tutti i gatti hanno contribuito egualmente a tutte le sessioni di campionamento: 31 gatti (20 femmine, 11 maschi) hanno contribuito al primo campionamento, 30 al secondo (21 femmine, 9 maschi) e solo 21 al terzo (15 femmine, 6 maschi). Perciò si sono potuti confrontare 18 femmine e 2 maschi fra la prima e la seconda sessione di campionamento, 15 femmine e 6 maschi fra la seconda e la terza, e solo 13 femmine e 5 maschi hanno campionamenti completi.

### *DIFFERENZE TRA MASCHI E FEMMINE*

Non è emersa nessuna differenza significativa.

### *ANDAMENTO NEL TEMPO*

L'ANOVA di Friedmann accompagnata dal coefficiente di concordanza di Kendall ha evidenziato una differenza significativa nei valori di cortisolo nel pelo raccolto nelle tre sessioni di campionatura ( $P < 0,00016$ ; coefficiente di concordanza = 0,485) (grafico 23). Questa differenza è stata confermata dal test di Wilcoxon a campioni appaiati applicato ai valori rilevati in due sessioni di campionatura alla volta.



**Grafico 23:** Cortisolo pilifero: C<sub>1</sub> vs C<sub>2</sub> (N=25),  $P=0,04$ ; C<sub>2</sub> vs C<sub>3</sub> (N=21),  $P=0,00007$ ; C<sub>1</sub> vs C<sub>3</sub> (N=19),  $P=0,01$ .

Tutti i valori di  $P$  sono relativi ad una ipotesi bidirezionale, quando non specificato diversamente. Tuttavia l'ipotesi sperimentale era monodirezionale e viene confermata nella direzione prevista.

L'andamento è stato lo stesso rilevato per i valori fecali: una flessione nel cortisolo tra il primo ed il secondo campionamento seguito da un incremento durante il terzo campionamento.

I gatti hanno mostrato una coerenza interna nei loro valori individuali attraverso i periodi, dal momento che le associazioni tra i valori individuali stessi sono state positive in modo significativo, con valori di  $P$  che variano da 0,04 a 0,000001 (il test di Spearman è stato applicato a valori di  $N$  uguali rispettivamente a 25, 21 e 19 a seconda della sessione di campionamento considerata).

Sulla base di quanto emerso, è stata evidenziata una concordanza tra i dati ormonali rivelati nelle feci e nel pelo.



## ESPERIMENTO 3 – DIFFERENZE COMPORTAMENTALI ED ENDOCRINE IN RELAZIONE ALLA DISPONIBILITA' DI SPAZIO

### SCOPI

La finalità di questa ricerca è stata il confronto tra oasi feline di diversa estensione spaziale per valutare come varia lo stress nelle varie popolazioni feline in rapporto allo spazio disponibile.

### MATERIALI E METODI

#### AMBIENTE DI STUDIO

Lo studio è stato condotto su gatti residenti in sette oasi feline. Per comodità di studio le oasi verranno indicate come: OASI C, OASI M, OASI F, OASI G, OASI P, OASI PC ed OASI PM. Prendiamo in considerazione le strutture in questione:

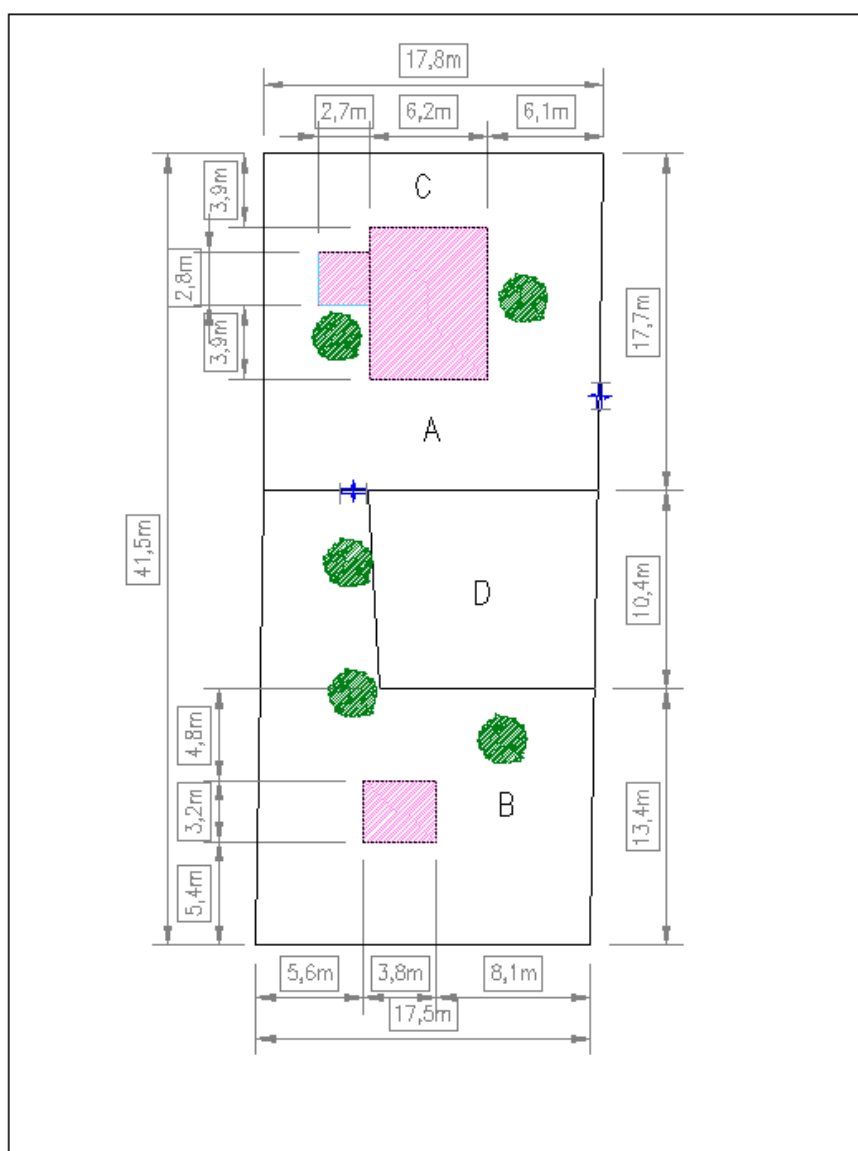
**OASI C** → gattile privato nato circa dieci anni fa per ospitare una colonia felina indipendente.

L'oasi ospita in media 77 gatti che dispongono di 658 m<sup>2</sup>; lo spazio pro-capite è quindi di 8,52 m<sup>2</sup>/gatto. Il perimetro è di 142 m ed è cinto da una rete metallica a maglie romboidali; inoltre, a circa mezzo metro da terra, sono collocati pannelli in vetroresina ed esternamente l'intera struttura è circondata da una siepe. L'oasi dispone di locali chiusi e di un vasto giardino intercomunicanti tra loro ed interamente accessibili agli animali. Oltre all'area appena menzionata che costituisce l'ambiente dedicato alle osservazioni è presente un area di degenza/quarantena dell'estensione di 124 m<sup>2</sup>. All'interno dell'oasi si trovano tre casette (di cui una nell'area di degenza), riscaldate d'inverno e mantenute fresche in estate, che sono adibite per la maggior parte a dormitorio; le pareti sono attrezzate con ripiani e mensole sopraelevate sulle quali sono collocate ceste in vimini (circa un centinaio in tutto).

Nel giardino sono presenti alberi, ciotole, distributori di acqua, cucce, lettini, cassette igieniche contenenti lettiera, ecc. I pasti vengono distribuiti due volte al giorno: alle ore 15:00 viene somministrato cibo fresco ed alle 17:00 viene fornito cibo in scatola. Della struttura si occupano 7 volontari ed alcuni ragazzi che svolgono il servizio civile.

Per comodità di studio l'area adibita alle osservazioni è stata suddivisa in quattro sezioni, definite arbitrariamente (figura 16):

- **sezione A:** che comprende l'area d'ingresso all'oasi, la casetta più grande ed un tratto di giardino;
- **sezione B:** costituita dalla seconda casetta, da giardino e da un corridoio erboso che la connette con la sezione A;
- **sezione C:** composta da una porzione di prato adiacente all'area A (retrostante la casetta più grande) ed adibita a deposito di materiali utili alla manutenzione;
- **sezione D:** area di degenza/quarantena non sfruttata per le osservazioni.

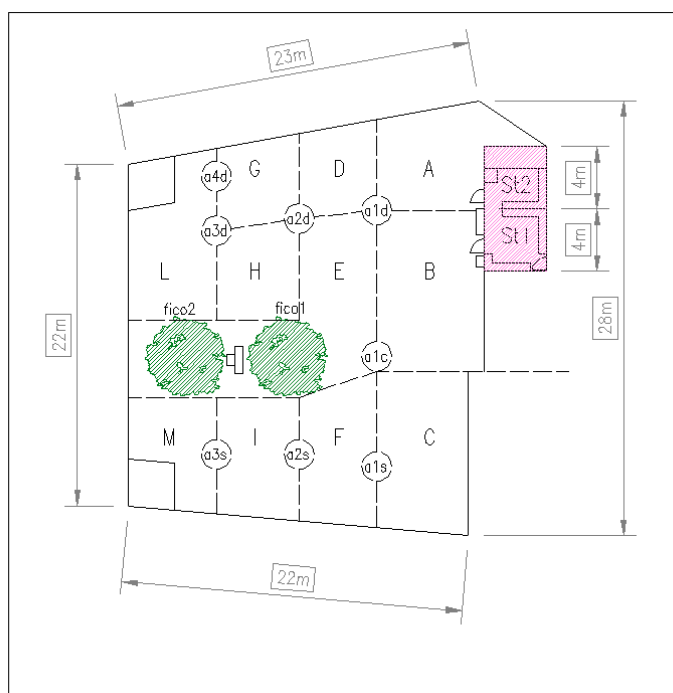


**Figura 16:** Planimetria oasi felina C.

**OASI M** → canile-gattile privato. Nell'oasi in media sono ospitati 100 soggetti alloggiati in due locali chiusi ed un giardino tra loro intercomunicanti. Il perimetro dell'oasi è di circa 93 m ed è completamente recintato con una rete metallica a maglie romboidali.

I locali chiusi sono attrezzati con 2 o 3 livelli di mensole sopraelevate, poste lungo il perimetro delle stanze, sulle quali sono collocate cuccette in materiale plastico, cassette igieniche contenenti segatura e distributori di cibo secco ed acqua. In uno dei due locali, è stata ricavata una zona utilizzata come area di quarantena. Nella zona “giardino” sono presenti alberi, lettini, casette per animali, distributori di acqua e di cibo, ecc.

I gatti hanno libertà di movimento all'interno dei locali e del giardino, quindi tutta l'area è completamente accessibile ai soggetti e all'osservatore. La superficie complessiva a disposizione dei gatti è di circa 610 m<sup>2</sup>, quindi la disponibilità di spazio pro-capite è pari a 6,10 m<sup>2</sup>/gatto. Il gattile è stato suddiviso arbitrariamente in 14 aree (figura 17) indicate con le lettere dalla A alla M e con le diciture fico1, fico2. I due locali chiusi vengono indicati rispettivamente con St1 e St2.



**Figura 17:** Planimetria oasi felina M.

Il cibo, prevalentemente di tipo umido, viene somministrato ai gatti due volte al giorno in orari fissi (14:30 e 21:00). La gestione del gattile viene effettuata da 4 dipendenti dell'Ente gestore e da 12 volontari.

Il gattile è inoltre dotato, di locale per le operazioni di pulizia, lavaggio e disinfezione di materiali ed attrezzature; locale cucina dove avviene la preparazione dei cibi; ambulatorio veterinario.

**OASI F** → si tratta di un'oasi privata che presenta una superficie complessiva di 160,56 m<sup>2</sup> ed un perimetro di 52,3 m interamente recintata con rete metallica a maglie rettangolari e romboidali e chiusa superiormente da una rete metallica a maglie esagonali. Sono ospitati nel gattile in media 40 gatti e considerando che l'estensione dell'area presa in esame per lo studio è pari a 94 m<sup>2</sup>, lo spazio pro-capite, calcolato in base alla media dei soggetti presenti è di 2,65 m<sup>2</sup>/gatto.

Il gattile è suddiviso in tre aree separate per mezzo di reti metalliche a maglie rettangolari: area infermeria, area quarantena e area residenti.

L'area residenti rappresenta l'area di studio; in cui alloggiano gatti adulti e sani. In quest'area è presente un container, suddiviso in due ambienti distinti per il riparo dei gatti, ed un box metallico utilizzato come magazzino. In ogni ambiente sono presenti mensole, cassette igieniche contenenti lettiera e ciotole per cibo ed acqua. In questa sezione i gatti dispongono anche di uno spazio all'aperto pavimentato con piastrelle in cemento e corredato di arbusti, tronchi, latrina in muratura, lettini, cuccette e ciotole per cibo ed acqua.

Per facilitare la raccolta e la successiva analisi dei dati, l'intera area residenti è stata arbitrariamente suddivisa in 5 zone (figura 18): A, B1, B2, D ed L1. Gli ambienti chiusi presenti sono stati indicati con C1 e C2 e la lettiera in muratura esterna con L2.

Il cibo sia secco che umido viene somministrato una volta al giorno dalle ore 10:00 alle ore 13:30.

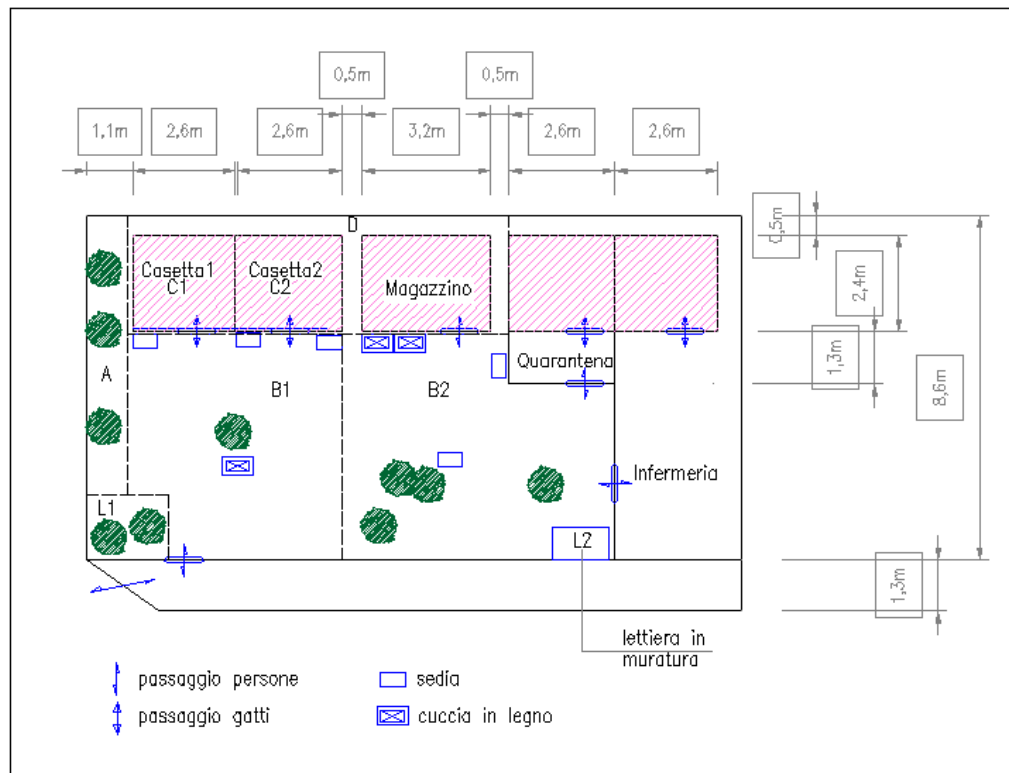


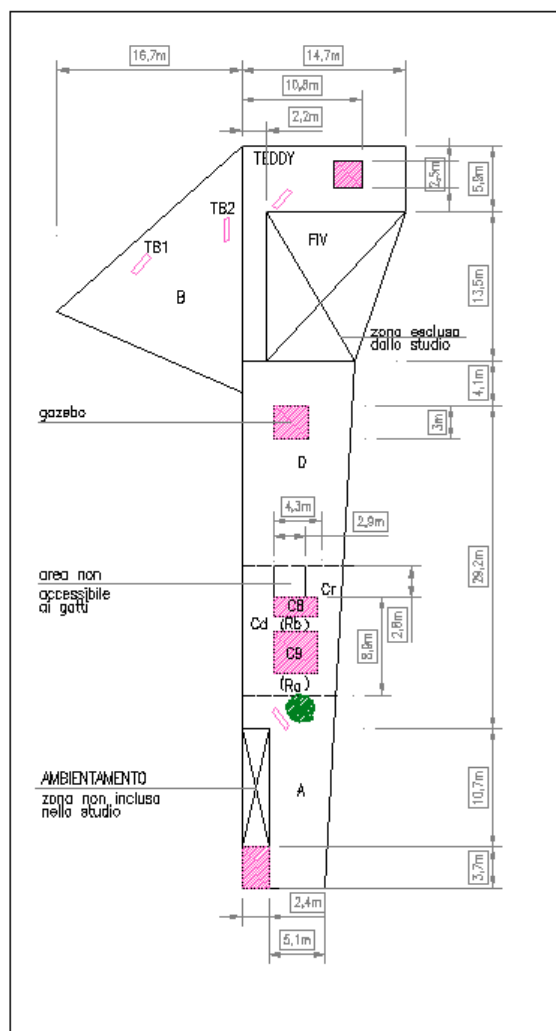
Figura 18: Planimetria oasi felina F.

**OASI G** → si tratta di un gattile privato. La struttura presenta un'estensione complessiva di  $802 \text{ m}^2$  ed è completamente recintata da una rete a maglie rettangolari, la cui parte superiore è ripiegata all'interno ed ulteriormente rivestita da lastre di plastica rigida per ridurre le possibilità di fuga dei gatti residenti. La struttura ospita un numero di individui abbastanza variabile, in media di 35,5 soggetti; la disponibilità di spazio pro-capite, calcolata sulla media delle presenze è quantificabile in  $18,20 \text{ m}^2/\text{gatto}$ .

Il gattile è costituito da quattro aree separate da rete metallica:

- **area ambientamento:** in cui vengono ospitati i soggetti appena entrati nell'oasi;
- **area FIV:** ospita i gatti affetti da FIV;
- **area Teddy:** area ospitante 4 soggetti con problemi alimentari,
- **area principale:** di estensione pari a  $647,60 \text{ m}^2$ , dotata di un'area coperta composta da due roulotte (indicate sulla planimetria come RA ed RB) unite tra loro da una struttura chiusa (C9). Le zone appena citate sono ricche di scaffali, armadietti, cucce, gabbie, ciotole per acqua e cibo; il tutto è affiancato da un'area coperta (indicata con C8). In prossimità dell'ingresso dell'oasi è collocata un'ulteriore casetta adibita essenzialmente a dormitorio. In questo settore ritroviamo anche la presenza di un gazebo. Nella porzione all'aperto troviamo

diverse cucce in legno e cassette igieniche contenenti lettiera; oltre ad alberi ed arbusti e ad alcuni tronchi caduti (indicati con TB1 e TB2). Quest'area è stata arbitrariamente suddivisa in quattro sezioni (figura 19): A, B, C (divisa in due porzioni Cd e Cr) e D.



**Figura 19:** Planimetria oasi felina G.

Il cibo umido e secco viene somministrato due volte al giorno mattina e sera ad orari variabili.

Nel corso dello studio, nella presente oasi felina, l'ambiente ha subito notevoli modifiche indipendenti dalla nostra volontà e legate ad opere di ristrutturazione che hanno portato inevitabilmente ad una notevole variabilità ambientale.

**OASI P** → fondata otto anni fa. E' costituita da un'area erbosa in cui sono ospitati in media 120 gatti che vivono insieme ad alcuni cani, animali da cortile e da laboratorio

(quali cavie, conigli, ecc.). L'estensione approssimativa destinata ai gatti è di circa 1700 m<sup>2</sup>, quindi 14,17 m<sup>2</sup> pro-capite, il tutto circondato da una rete metallica.

All'interno del gattile sono presenti quattro cassette in legno e tre box in laminato (figura 20). I soggetti hanno libero accesso a queste strutture grazie a porte basculanti. Le sette strutture sono dotate di letti a castello, ripiani e scaffali a loro volta forniti di cuscini, coperte e ceste. Cassette igieniche, contenenti trucioli di legno, sono presenti in tutta l'area di studio come anche ciotole per cibo ed acqua. Gli animali vengono riforniti di cibo una volta al giorno ad orari variabili; si tratta soprattutto di cibo umido per lo più scatolette o rimanenze di alberghi e ristoranti.

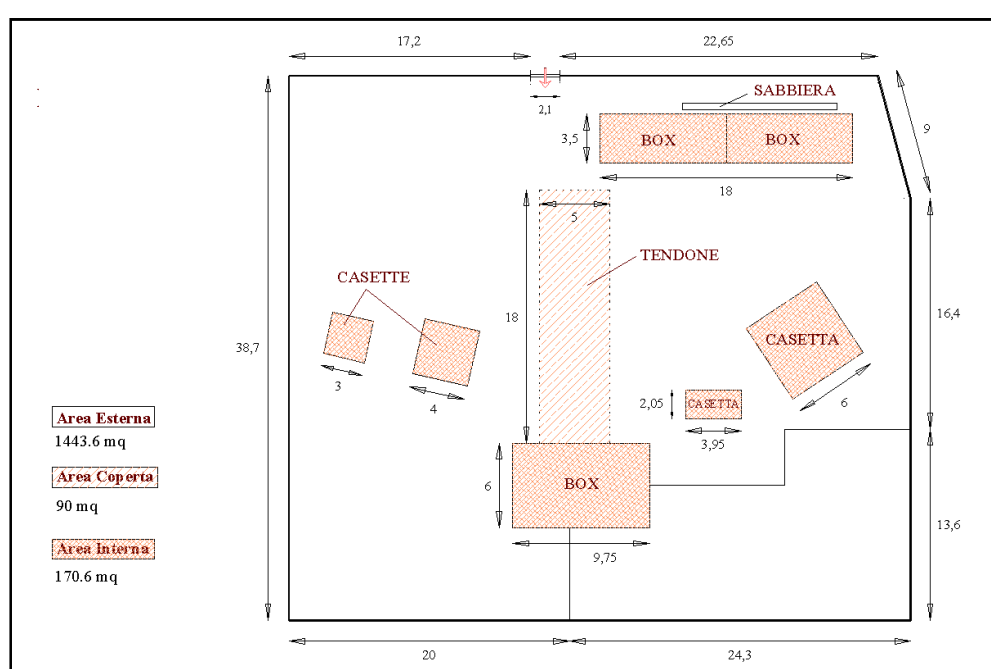


Figura 20: Planimetria oasi felina P.

**OASI PC** → la struttura è delimitata da una rete metallica alta 2.70 m con la parte superiore inclinata a 45° verso l'interno; in più, pannelli di *plexiglass* di 50 cm sono posti a 1,5 m da terra. Comprende due strutture in muratura: una principale, estesa su due piani, ed una di dimensioni inferiori connesse ad un cortile e ad un ampio giardino. I gatti ospitati sono mediamente 160 suddivisi in gruppi:

- **gruppo C:** gatti con spiccate attitudini domestiche per lo più abbandonati;
- **gruppo P:** gatti provenienti da colonie;
- **gruppo Q:** gatti soggetti a diversi tipi di patologie.

I soggetti erano già stati suddivisi nelle diverse strutture a disposizione come segue: i soggetti affetti da FIV e FELV collocati nella zona isolamento al piano terra

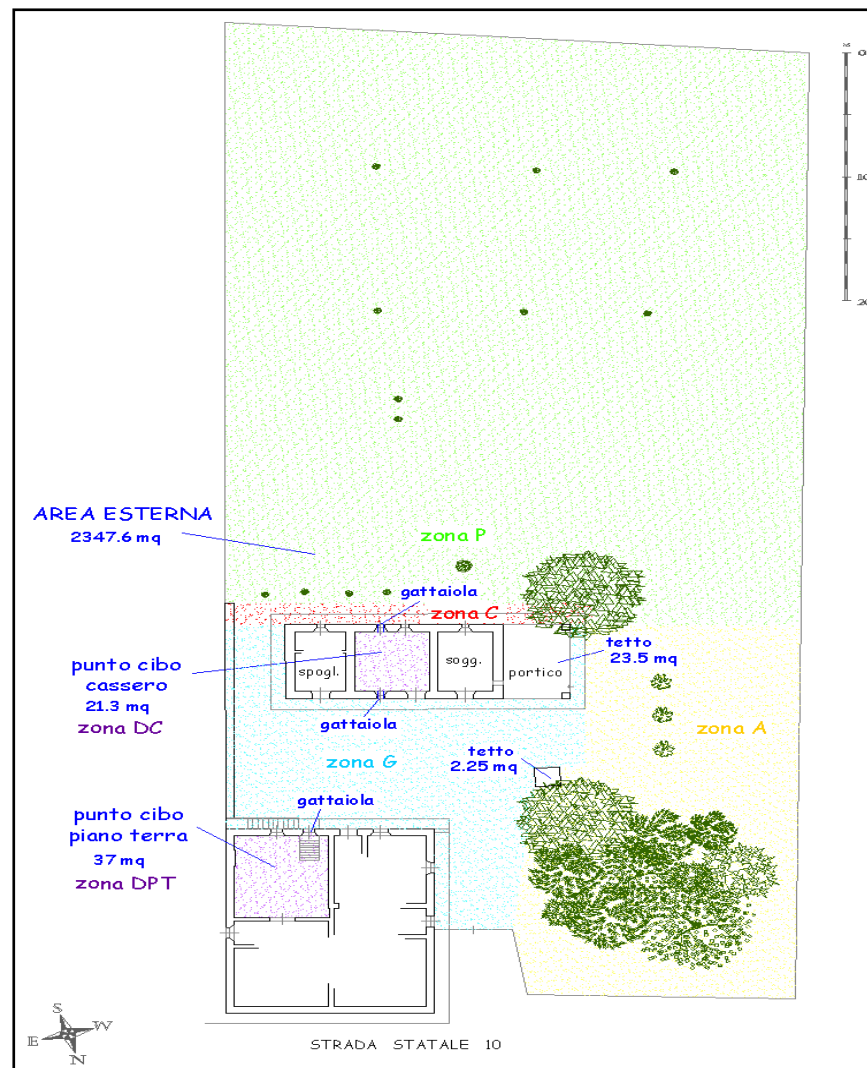
dell'edificio principale; quelli con patologie di tipo non contagioso nel “soggiorno” (indicato sulla planimetria con sogg.) con la possibilità di accedere ad un'area adibita a porticato mentre gli individui sani cioè la maggior parte, che appartengono ai gruppi C e P sono stati collocati nelle due stanze adibite a punti cibo dell'area esterna (rispettivamente di 21,3 m<sup>2</sup> e 37 m<sup>2</sup>); i soggetti in questione hanno a disposizione un' area di circa 2410 m<sup>2</sup> ed uno spazio pro-capite di 67 m<sup>2</sup>/gatto. Il campo di studio per comodità è stato suddiviso in diversi settori (figura 21):

- **zona G:** cortile coperto di ghiaia antistante ad entrambi gli edifici;
- **zona A:** settore ombreggiato da diversi alberi che comprendente un piccolo vano in muratura;
- **zona P:** vasta area erbosa in cui si trovano piante giovani ed una struttura metallica di una piccola serra;
- **zona DC:** “punto cibo cassero” in comunicazione tramite gattaiole con le aree G e C;
- **zona DPT:** “punto cibo piano terra” e seminterrato collegato al cortile;
- **zona C:** marciapiede e porzione di prato contigua all'edificio accessibile tramite una finestra che i gatti raggiungono grazie ad una scala.

Tutte le aree sono dotate di igloo in plastica, brandine, scatoloni, cassette igieniche contenenti trucioli di legno, ciotole per acqua e cibo.

Il cibo viene distribuito giornalmente ed in orari variabili.





**Figura 21:** Planimetria oasi felina PC

**OASI PM** → oasi privata che ospita una colonia felina urbana. La struttura ospita mediamente 20 gatti alloggiati in una superficie di 1000 m<sup>2</sup> con uno spazio pro-capite di 50 m<sup>2</sup>/gatto. Nell'oasi è presente un giardino ombreggiato grazie alla presenza di alberi, in più, sono presenti nella struttura: un locale in legno chiuso da pannelli di onduline denominato “cucinino” ed un adiacente edificio in muratura costituito da ingresso, legnaia e due stanze riscaldate con stufe a legna.

Il giardino è delimitato da porzioni di mura in mattoni e da una rete metallica alta circa 2 m; i gatti possono entrare ed uscire liberamente attraverso varchi della recinzione.

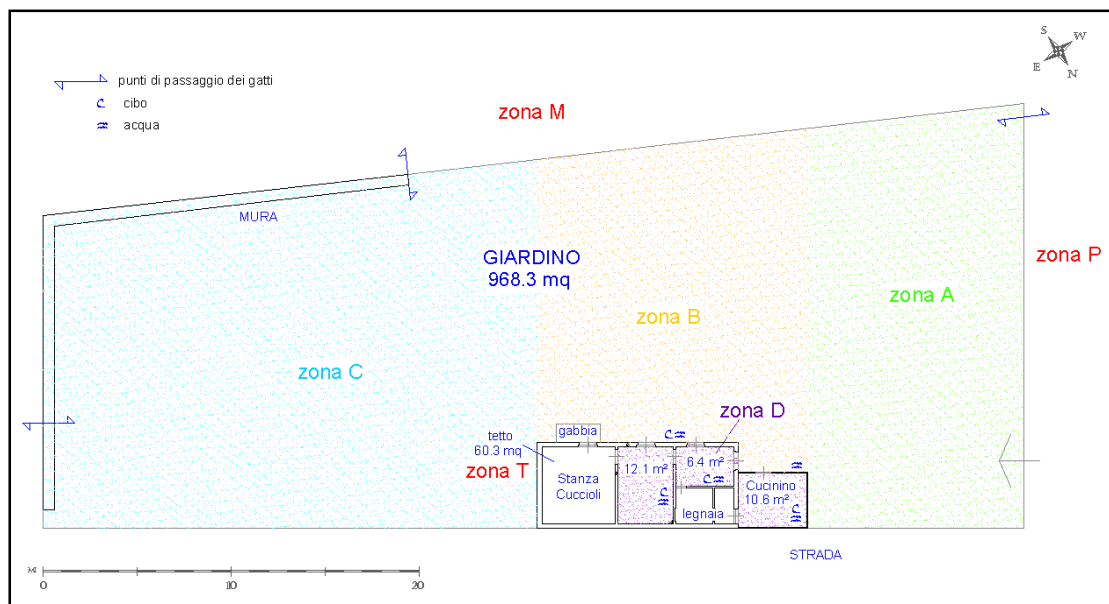
Anche questo gattile è stato suddiviso, per comodità, in aree di studio (figura 22):

- **zone P ed M:** rappresentano un parcheggio ed un'area militare che si trovano nei pressi dell'oasi, alle quali i gatti hanno accesso e che da questa sono facilmente visibili;

- **zone D e T:** interno e tetti dei fabbricati;
- **zone A, B e C:** giardino.

Anche in questa struttura la distribuzione dei pasti avviene giornalmente in orari variabili.

Per quanto riguarda la presente oasi esiste una particolarità: essa è in comunicazione, mediante varchi, con l'area militare, di cui abbiamo fatto menzione poco sopra, non accessibile al pubblico. I gatti quindi hanno avuto a disposizione una superficie molto maggiore dei 1000 m<sup>2</sup> da attribuirsi esclusivamente al gattile, che nelle analisi statistiche è stata considerata pari a 4000 m<sup>2</sup> con una superficie pro-capite di 100 m<sup>2</sup>/gatto.



**Figura 22:** Planimetria oasi felina PM.

Come possiamo vedere le oasi prese in esame presentano varie similitudini, tutte sono recintate allo scopo di impedire, per quanto possibile, la fuga dei soggetti ospitati e per garantire la loro *privacy* e tranquillità oltre che per difendere i gatti da eventuali pericoli (uomo, altri animali, veicoli, ecc).

Tutte quante le strutture presentano aree chiuse, alcune riscaldate, con funzione di riparo e ricovero, tutte corredate di ceste o cucce (solitamente collocate in alto su mensole o scaffali) oppure letti, divani, sedie, ecc. a loro volta forniti di panni, cuscini, stracci e maglioni che rendono i giacigli stessi più caldi e comodi. In queste stesse aree ritroviamo anche cassette igieniche fornite di lettiera o di trucioli di legno e distributori di acqua e cibo oltre alle classiche ciotole che vengono rifornite giornalmente. Non dobbiamo dimenticare l'ottima funzione di nascondiglio espletata da tetti e sottotetti in cui i soggetti

più timidi spesso si riparano per sottrarsi al contatto con l'uomo e con conspecifici. In aggiunta, le oasi presentano giardini e cortili di varia estensione, dotati di alberi, arbusti e cespugli che forniscono nascondigli e consentono ai gatti di mimetizzarsi. Anche le aree esterne sono fornite di brandine, cuccie, igloo in plastica, latrine spesso in muratura o cassette igieniche, ciotole per acqua ed alimenti, tronchi, ecc. Elementi comuni sono anche le zone adibite ad infermeria/degenza o a quarantena; queste aree non sono state volutamente prese in considerazione nello studio alla luce del fatto che patologie od adattamento ad un nuovo ambiente, possono alterare i normali comportamenti ed i parametri ormonali dei soggetti.

Osservando la tabella 5 sottostante ci si potrebbe imbattere in una apparente anomalia: volendo calcolare il numero di  $m^2$ /gatto dividendo i  $m^2$  disponibili per ogni oasi per il numero dei gatti ospitati alle volte non c'è corrispondenza tra i dati, questo in ragione del fatto che il calcolo è stato effettuato dividendo il numero dei  $m^2$  disponibili in ogni oasi per il numero dei gatti compresenti nell'oasi stessa durante i rispettivi periodi di osservazione.

	OASI C	OASI M	OASI F	OASI G	OASI P	Oasi PC	OASI PM
<b>N° GATTI</b>	77	100	40	32-39	120	160	20
<b>MQ DISPONIBILI</b>	658	610	94	802	1700	2410	1000
<b>MQ/GATTO</b>	8,52	6,10	2,65	18,20	14,17	67	50
<b>PERIMETRO</b>	Rete metallica a maglie romboidali, pannelli in vetroresina e siepe esterna	Rete metallica a maglie romboidali	Rete metallica a maglie rettangolari e romboidali chiusa superioremente da una rete a maglie esagonali	Rete metallica a maglie rettangolari ripiegata superiormente e verso l'interno e rivestita di pannelli di plastica rigida	Rete metallica	Rete metallica alta 2,70 m con aggiunta di pannelli di plessiglass a 1,5 m di altezza	Porzione di mura e rete metallica alta 2 m
<b>STRUTTURA</b>	2 cassette in legno, giardino, area di quarantena/d egenza	2 cassette, giardino, area quarantena/d egenza	2 cassette, giardino, area quarantena/d egenza	4 cassette, 2 roulotte, giardino e area FIV	4 cassette, 3 box in laminato, giardino, area quarantena/d egenza	2 strutture in muratura, giardino	1 edificio in muratura, un piccolo vano in legno, giardino
<b>SOMMINISTR AZIONE PASTI</b>	2 volte al giorno alle ore 15:00 e 17:00	2 volte al giorno alle ore 14:30 e 21:00	1 volta al giorno dalle ore 10:00 alle ore 13:30	2 volte al giorno, mattina e sera, ad orari variabili	1 volta al giorno ad orari variabili	1 volta al giorno ad orari variabili	1 volta al giorno ad orari variabili

**Tabella 5:** Riassunto delle caratteristiche salienti delle oasi feline prese in esame nello studio.

## SOGGETTI DELLO STUDIO

Fra i criteri adottati per effettuare la selezione dei soggetti da prendere in esame per la ricerca, particolare rilevanza hanno assunto lo stato di salute ed il carattere dei soggetti: sono stati scelti individui privi di patologie che potessero in qualche modo alterare il comportamento o compromettere l'attendibilità delle analisi ormonali effettuate su pelo e feci. Inoltre, nelle settimane antecedenti l'inizio dello studio, dedicate all'addestramento dell'osservatore, ci si è accertati che l'eventuale timidezza o diffidenza dei soggetti non fossero tali da compromettere la reperibilità degli stessi durante le osservazioni. Tutti i soggetti selezionati sono meticci e la maggior parte di essi sono sterilizzati mediante interventi chirurgici rispettivamente di orchietomia per i maschi ed ovariectomia od ovario-isterectomia per le femmine.

Prendiamo ora in considerazione i soggetti selezionati nelle diverse oasi feline:

**OASI C** → sono stati selezionati 44 soggetti meticci di ambo i sessi di cui 26 femmine (59%) e 18 maschi (41%) di età compresa tra 1 e 16 anni, tutti sterilizzati ad eccezione di due maschi interi. Dei 44 soggetti che inizialmente facevano parte dello studio, 3 di essi sono morti nel corso della ricerca, 1 è stato affidato ad una famiglia, mentre per un quinto soggetto si sono effettuate solo osservazioni parziali, in ragione delle sue particolari condizioni di vita alle quali gli altri membri del gruppo lo costringono (confinamento su di un albero).



**Figura 23:** Soggetti dello studio.

**OASI M** → sono stati presi in esame 45 gatti meticci di ambo i sessi di cui 18 maschi (40%) e 27 femmine (60%) di età compresa tra 1 e 18 anni. Tutti gli individui erano sterilizzati.

**OASI F** → sono stati scelti 52 soggetti meticci anche in questo caso di ambo i sessi di cui 16 maschi (31%) e 36 femmine (69%) di età compresa tra 1 e 13 anni, tutti sterilizzati.

**OASI G** → sono stati selezionati 55 soggetti meticci di entrambi i sessi di cui 34 femmine (61,8%) e 21 maschi (38,2%), di età compresa tra 1 e 17 anni, tutti sterilizzati. Dei 55 individui scelti inizialmente 7 femmine e 2 maschi sono stati esclusi perché deceduti o adottati nel corso dello studio.

**OASI P** → sono stati scelti 44 soggetti di cui 20 femmine (45,45%) e 24 maschi (54,55%) di età compresa tra 1 e 8 anni, tutti sterilizzati. Fra i gatti inizialmente presi in esame ai fini dello studio 7 sono deceduti e 3 sono stati dati in adozione nel corso della ricerca.

**OASI PC** → sono stati selezionati 60 soggetti meticci di cui 28 maschi (46,7%) e 32 femmine (54,3%), di età compresa tra 1 e 12 anni, tutti sterilizzati ad eccezione di 3 maschi.

**OASI PM** → sono stati presi in considerazione 23 soggetti meticci di cui 13 maschi (56,5%) e 10 femmine (43,5%) di età compresa tra 1 e 10 anni, tutti sterilizzati ad eccezione di 3 maschi. Nel corso dello studio tre soggetti sono deceduti.

In alcuni gattili (OASI F, OASI G, OASI PM) i dati riguardanti il numero totale dei gatti ospitati nella struttura ed il numero dei soggetti osservati sono in conflitto, nel senso che il numero di gatti presi in esame per lo studio risulta essere maggiore del numero medio di gatti ospitati nella struttura stessa; questa difformità è dovuta proprio al fatto che il numero di gatti ospitati nelle oasi è in realtà un numero medio che indica il numero di soggetti compresenti durante l'intero periodo di studio, numero che ha subito variazioni in conseguenza alla morte od all'adozione di alcuni soggetti che, di conseguenza non sono stati osservati per l'intera durata della ricerca e sono stati sostituiti con individui entrati in oasi solo in periodi successivi all'inizio dei campionamenti. In particolare nelle tre oasi citate la situazione era di estrema mobilità. In alcune strutture i soggetti avevano addirittura la possibilità di uscire, altri venivano ricoverati in infermeria o dal veterinario per periodi più o meno lunghi e quindi non erano più osservabili. A questi eventi si sommano situazioni di routine come l'adozione od il decesso e le nuove introduzioni. Tutto ciò ha fatto sì che il numero di osservazioni, in particolare di campionamenti a focale non risultasse uguale per tutti gli individui.

Riassumendo il numero totale di gatti osservati è 323 di cui 185 (57,3%) femmine e 138 (42,7%) maschi, tutti sterilizzati ad eccezione di 8 soggetti di sesso maschile.

	OASI C	OASI M	OASI F	OASI G	OASI P	Oasi PC	OASI PM
<b>N° medio gatti presenti nelle oasi</b>	77	100	40	35,5	120	160	20
<b>N° gatti presi in esame</b>	44	45	52	55	44	60	23
<b>N° femmine</b>	26	27	36	34	20	32	10
<b>% femmine</b>	59	60	69	61,8	45,45	54,3	43,5
<b>N° maschi</b>	18	18	16	21	24	28	13
<b>% maschi</b>	41	40	31	38,2	54,55	46,7	56,5
<b>Range d'età (anni)</b>	Tra 1 e 16	Tra 1 e 18	Tra 1 e 13	Tra 1 e 17	Tra 1 e 8	Tra 1 e 12	Tra 1 e 10
<b>Sterilizzazione</b>	Tutti i soggetti sterilizzati tranne 2 maschi	Tutti i soggetti sterilizzati	Tutti i soggetti sterilizzati	Tutti i soggetti sterilizzati	Tutti i soggetti sterilizzati	Tutti i soggetti sterilizzati tranne 3 maschi	Tutti i soggetti sterilizzati tranne 3 maschi

**Tabella 6:** Dati riassuntivi relativi ai gatti selezionati nelle diverse oasi.

## DISEGNO SPERIMENTALE

La durata dell'intero studio è stata di 30 mesi con qualche piccola sovrapposizione dei periodi di osservazione (in alcuni momenti sono state osservate due oasi contemporaneamente).

Le osservazioni nelle singole oasi si sono svolte come di seguito riportato:

**OASI C** → la ricerca si è svolta nell'arco di 5 mesi. L'intero studio ha previsto 61 giorni di campionamento, per un totale di 248 ore di osservazioni effettive. Queste hanno avuto luogo prevalentemente la mattina, con variazioni nell'orario di inizio e di conclusione, dovuti per lo più alle condizioni climatiche e ad esigenze organizzative interne dell'oasi.

Ogni sessione di studio prevedeva un alternarsi di focali e scansioni; senza interruzioni tra uno e l'altra: ad un campionamento focale ne seguiva subito uno a scansione, quindi un secondo a focale e così via, per una durata di 4 o 5 ore giornaliere.

La durata dei focali era di 20 minuti, il numero medio dei focali realizzati durante il periodo di studio corrisponde a 569, mentre quello delle scansioni è pari a 26427. Ciò implica un totale di 14 focali (280 minuti/animale) e 633 scansioni per ognuno di quei soggetti che hanno presenziato all'intera ricerca. Per 4 dei 44 individui selezionati inizialmente non è stato possibile completare il ciclo di osservazioni, a causa di tre decessi e un'adozione, mentre per uno di essi si sono potute effettuare in modo completo soltanto le scansioni (in conseguenza alle particolari condizioni di vita da esso condotte).



I dati relativi a questi quattro individui sono stati eliminati da tutte le analisi comportamentali, ma utilizzati, per quanto possibile, in quelle riguardanti il cortisolo.

**OASI M** → la durata dello studio è stata di 5 mesi; le osservazioni si sono svolte giornalmente fra le 16:00 e le 21:00. Si sono effettuati focali della durata di 10 minuti che venivano ripetuti ogni 20 e scansioni tra un focale e l'altro.

L'intero studio ha, dunque, previsto 61 giorni di campionamento, per un totale in media di 804 campionamenti focali (pari a 190 minuti/animale per i soggetti presenti nell'intero periodo della prova) e 821 scansioni.

A causa del decesso di 6 gatti (3 maschi e 3 femmine) durante lo svolgimento dello studio, il numero totale di focali e scansioni pro-capite non è stato uguale per tutti i soggetti. Anche in questo caso i dati di questi soggetti sono stati eliminati da tutte le analisi comportamentali, ma conservati, quando possibile, in quelle riguardanti gli ormoni.

**OASI F** → la durata delle osservazioni è stata di 6 mesi, per un totale di 124 giornate di campionamento.

Le osservazioni sono state organizzate in blocchi di focali della durata di 20 minuti e scansioni consecutive.

Durante lo studio sono stati effettuati in media 468 focali pari 9 focali pro-capite (pari a 360 minuti/animale) e 400 scansioni per i soggetti presenti per l'intero studio.

Nel corso dello studio si sono verificati numerosi cambiamenti nell'ambito del gruppo inizialmente scelto, alcuni soggetti sono stati adottati, altri sono deceduti, altri ancora sono entrati nell'area infermeria da noi non considerata ai fini della ricerca. Di conseguenza le osservazioni comportamentali dei soggetti che hanno avuto una permanenza al gattile più breve, sono state limitate alle sole scansioni, quindi il numero totale di focali e scansioni pro-capite non è risultato uguale per tutti gli individui.

**OASI G** → lo studio ha avuto una durata di 8 mesi, per un totale di 56 giornate di campionamento.

La durata di ciascun focale è stata di 15 minuti per ciascun soggetto.

Le osservazioni si sono svolte al mattino tra le 7:30 e le 14:30 essendo il gattile non accessibile all'osservatore in orario pomeridiano.

L'intero studio ha previsto un totale di 287 focali e 333 scansioni. Il numero di focali per i gatti facenti parte del campione considerato, è compreso tra 3 e 9, con una media di 7 focali per animale, pari, quindi a 120 minuti di campionamento/soggetto.

A causa dell'elevato *turnover* dei soggetti presenti nell'oasi e della possibilità degli stessi di uscire e non essere, quindi, visibili all'osservatore in ogni momento, non tutti gli individui presentano un ugual numero di focali e di scansioni.

**OASI P** → le osservazioni hanno avuto una durata di 3 mesi.

Ogni sessione di studio prevedeva un alternarsi di campionamenti a scansione e focali della durata di 20 minuti. Al termine dello studio il numero di scansioni e focali effettuati è stato pari rispettivamente a: 6133 e 178.

Il numero dei focali pro-capite nell'oasi in questione non è stato costante per tutti i soggetti, a causa dell'estrema variabilità della popolazione felina; si stima che il numero di focali/soggetto vari tra 4 e 13 pari in media a 170 minuti di campionamento/soggetto.

**OASI PC** → la durata della ricerca è stata di circa 4 mesi, le osservazioni si sono svolte giornalmente ad orari variabili. La durata dei campionamenti a focale è stata di 20 minuti per ciascun soggetto. Anche in questo caso il numero di focali realizzati per ogni gatto è stato estremamente variabile a causa della plasticità della popolazione felina di quest'oasi che era spesso soggetta a variazioni nel numero di individui osservati; si stima che il numero medio di focali sia stato 120 mentre il numero di focali pro-capite è stato pari a 6 per soggetto, quindi in media ogni individuo è stato osservato per 120 minuti. Il numero di scansioni effettuate è pari a 9240.

**OASI PM** → il periodo di studio è stato di 4 mesi; le osservazioni si sono svolte giornalmente ed in orari variabili. La durata dei campionamenti a focale è stata di 20 minuti per ciascun soggetto. Anche in questo caso, come nel precedente, il numero di focali realizzati per ogni gatto è stato estremamente variabile a causa della plasticità della popolazione felina che era spesso soggetta a variazioni nel numero di individui osservati; si stima che il numero medio di focali sia stato 120 mentre, il numero di focali pro-capite è stato pari a 6 per soggetto, quindi in media ogni individuo è stato osservato per 120 minuti. Il numero delle scansioni effettuate è pari a 2856.



	<b>OASI C</b>	<b>OASI M</b>	<b>OASI F</b>	<b>OASI G</b>	<b>OASI P</b>	<b>Oasi PC</b>	<b>OASI PM</b>
<b>Durata (mesi)</b>	5	5	6	8	3	4	4
<b>Svolgimento osservazioni</b>	4-5 ore giornaliere in orario mattutino	Giornalmente tra le 16:00 e le 21:00	Giornalmente dalle 9:00 alle 12:00 e dalle 16:30 alle 21:00 in estate; dalle 9:00 alle 12:30 e dalle 14:30 alle 18:00 in inverno	Giornalmente dalle 7:30 alle 14:30	4-5 ore giornaliere in orari variabili	Giornalmente ad orari variabili	Giornalmente ad orari variabili
<b>Durata focali (minuti)</b>	20	10	20	15	20	20	20
<b>N° medio focali</b>	569	804	468	287	178	120	120
<b>N° scansioni</b>	26427	821	400	333	6133	9240	2856
<b>N° medio focali/animale</b>	14	6-19	9	3-9	4-13	6	6
<b>Minuti/animale</b>	280	190	360	120	170	120	120

**Tabella 7:** Riassunto delle modalità con cui si sono svolte le osservazioni nelle oasi feline considerate.

## RACCOLTA E TRATTAMENTO DEL MATERIALE BIOLOGICO

Nel corso dello studio, durante l'attività di osservazione e registrazione dei comportamenti, sono stati prelevati campioni di feci. Ogni campione è stato raccolto al momento dell'emissione, prestando attenzione a che non venisse contaminato da altri escrementi, presenti nel luogo in cui l'animale espletava il bisogno. Le feci venivano quindi collocate in apposite buste di plastica, identificate per mezzo di un'etichetta recante data e ora di emissione e soggetto di appartenenza e conservate ad una temperatura di -20°C.

All'inizio del periodo di osservazione ed al termine dello stesso, in giornate diverse da quelle in cui i gatti sono stati sottoposti alle sessioni di osservazione, sono stati raccolti anche campioni di pelo. Nelle oasi in cui è stato possibile sono stati fatti più di due prelievi nell'arco del periodo (OASI F, P, PM ed PC).

Il pelo è stato raccolto dalla regione lombo-sacrale-coccigea mediante rasatura effettuata con forbici quando possibile, mentre nei soggetti meno collaborativi, è stato raccolto pelo deciduo. Il materiale così raccolto è stato subito posto in buste di plastica a

chiusura ermetica, identificato per mezzo di un'etichetta riportante: nome del soggetto, data, regione anatomica di prelievo e successivamente conservato a temperatura ambiente. Nella seconda sessione di prelievo si è fatta attenzione a che il materiale biologico provenisse dalla medesima area anatomica utilizzata nella prima.

---

## METODI DI ANALISI

Sui campioni di pelo e feci sono state valutate le concentrazioni di cortisolo mediante le metodiche radioimmunologiche (RIA) descritte precedentemente.

---

## ANALISI STATISTICA

Per l'analisi statistica dei dati raccolti sono stati utilizzati, oltre ai test citati precedentemente, i seguenti test:

- test di Kruskal-Wallis ANOVA per ranghi e test della mediana per saggiare le differenze tra più di due variabili indipendenti;
- coefficiente di determinazione  $R^2$  per valutare quanto il variare di un fattore rendesse conto delle mutazioni della variabile in esame.

---

## RISULTATI E DISCUSSIONE

---

### DATI ORMONALI

I risultati delle concentrazioni ormonali sono stati calcolati per l'intero campione e per femmine e maschi separatamente.

---

### *DIFFERENZE TRA MASCHI E FEMMINE*

Poiché non è stata trovata nessuna differenza significativa (utilizzando il Test ad U di Mann-Whitney, per tutte le categorie saggiate), né per quel che riguarda le frequenze comportamentali né per quanto concerne i valori medi individuali del cortisolo, i dati sono stati sempre considerati insieme per i due sessi.

---

### *STEROIDI FECALI*

Sono state utilizzate le medie individuali sul rispettivo periodo di studio. Poiché non in tutte le colonie è stato possibile raccogliere un adeguato numero di campioni, i dati di solo 5 di esse sono stati utilizzati per il confronto. La tabella 8 elenca ed illustra la

disponibilità di spazio pro-capite e totale indicate rispettivamente come:  $m^2$  p.c. e  $m^2$  tot., inoltre riporta il valore medio di cortisolo (MEDIA), l'errore standard (E.S.), la deviazione standard (S.D.) e la mediana (MED.).

	<i><math>m^2</math> p.c.</i>	<i><math>m^2</math> tot.</i>	<b>CORTISOLO (pg/mg)</b>			
			<i>MEDIA</i>	<i>E. S.</i>	<i>S.D.</i>	<i>MED.</i>
<b>OASI F</b>	2,65	94,30	1,1022	0,17745	0,9880	0,9094
<b>OASI M</b>	6,10	610,00	0,6220	0,14212	0,7106	0,4462
<b>OASI C</b>	8,52	658,00	0,4907	0,04824	0,3163	0,4487
<b>OASI PC</b>	67,00	2410,00	0,2026	0,05423	0,2169	0,1071
<b>OASI PM</b>	100,00	4000,00	0,1372	0,05956	0,1883	0,0728

**Tabella 8:** Nella tabella viene riportato lo spazio pro-capite ( $m^2$ p.c.) e lo spazio totale ( $m^2$ tot.) oltre al valore medio (MEDIA), l'errore standard (E.S.), la deviazione standard (S.D.) e la mediana per quel che concerne il cortisolo, in 5 oasi feline.

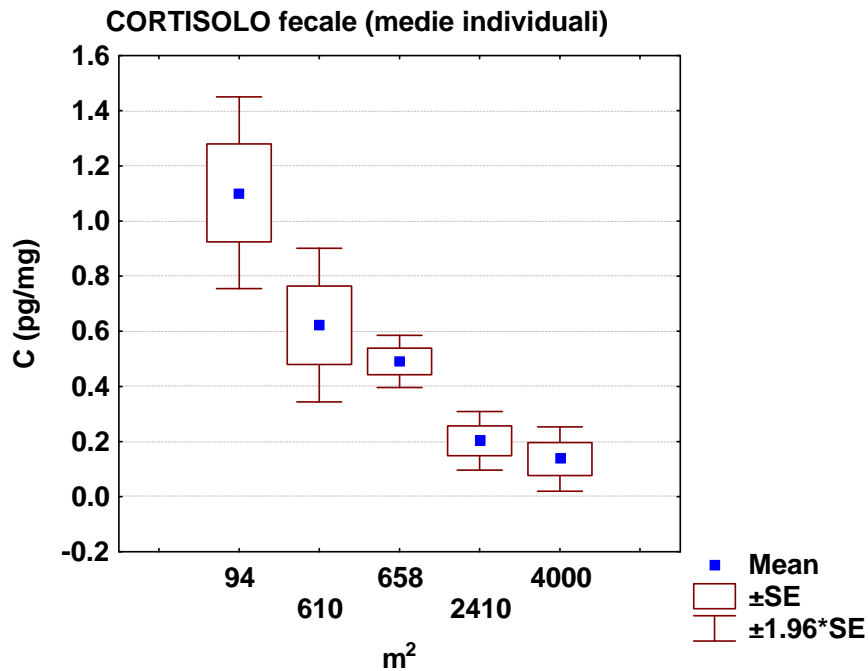
Sono state saggiate le differenze tra i valori medi e mediani di cortisolo delle 5 colonie considerate tutte insieme. Per ottenere ciò è stato applicato sia il test di Kruskal-Wallis ANOVA per ranghi sia quello della mediana (indicati rispettivamente come K-W e MED. in tabella 9). In entrambi i casi la variabile discriminante è stata la quantità di spazio totale disponibile espressa in metri quadrati (l'andamento dei valori medi in funzione della quantità totale di spazio disponibile non differiva significativamente da quello in funzione della disponibilità di spazio pro-capite).

I risultati sono riportati in tabella 9.

<b>TEST</b>	<b>Cortisolo</b>
K-W:	H (4, N=125) = 33,12 P = 0,0000
MED.	Mediana = 0,424913 $\chi^2 = 18,29409$ , df = 4 P = 0,0011

**Tabella 9:** Differenze tra i valori medi e mediani di cortisolo saggiati sulla totalità del campione N=125. Sono stati applicati i Test di Kruskal-Wallis ANOVA ed il Test della mediana rispettivamente indicati come K-W e MED.

Dunque, secondo entrambi i test, le tendenze centrali delle 5 colonie differivano significativamente tra loro. La direzione di tale diversità è illustrata nel grafico seguente rappresentante i valori medi,  $\pm$  l'errore standard e  $\pm 1,96$  l'errore standard.

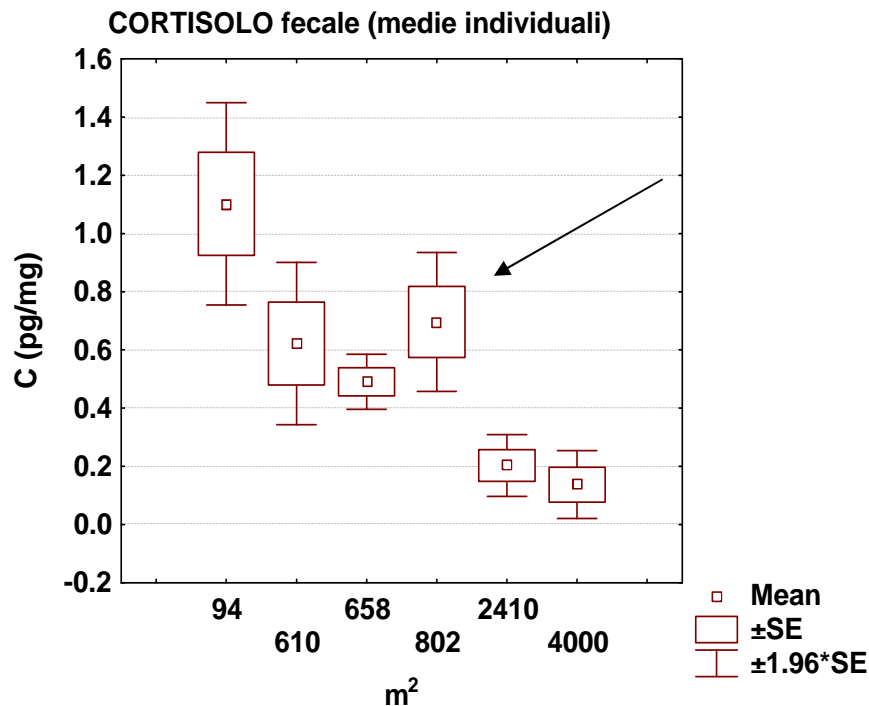


**Grafico 24:** Direzione della diversità nelle 5 colonie: rappresentazione dei valori medi,  $\pm$  l'errore standard e  $\pm 1,96$  l'errore standard per il cortisolo.

Dall'esame del grafico si può dedurre che una bassa disponibilità di spazio si accompagna ad alti livelli di cortisolo. Poiché alti valori di cortisolo denotano uno stato di stress, possiamo ritenere che una bassa disponibilità di spazio in qualche modo si accompagni ad uno stato di stress e, viceversa, uno stato di benessere/buona adattabilità alle sfide socio-ecologiche caratterizzi quegli individui che godono di un'ampia disponibilità di spazio.

Tuttavia, l'inclusione di un'altra colonia, esclusa dall'analisi per alcune peculiarità che la rendevano non confrontabile, ci dimostra come fattori locali possano co-influire sui valori ormonali, agendo in maniera contraria alla disponibilità di spazio.

Nel grafico 25 la colonia G (freccia), a fronte di un'elevata disponibilità di spazio (18,2 m²/gatto, 802 complessivi), presenta valori di cortisolo relativamente elevati. Il fattore di confusione, probabilmente determinante questa "anomalia", lo stesso per cui la colonia è stata esclusa dalle analisi, è l'elevatissimo *turnover* degli animali, a causa di frequenti adozioni, qualche decesso, nuove immissioni, reiterati soggiorni presso cliniche veterinarie, spostamenti interni, fughe temporanee, ecc. A questa instabilità sociale si accompagnava un'altrettanto elevata variabilità territoriale, causata dai frequentissimi lavori di adeguamento delle strutture, modificazioni spesso imponenti. Tutte queste variazioni sembra abbiano avuto un effetto negativo su molti gatti, che passavano gran parte del tempo nascosti o uscivano dalla struttura.

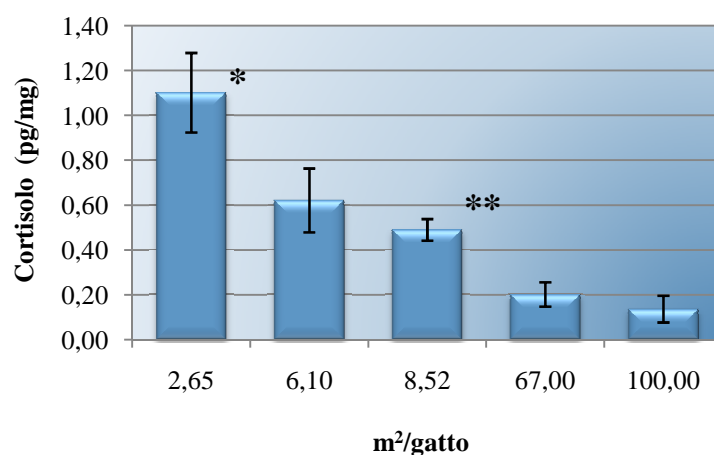


**Grafico 25:** Inclusione nello studio della colonia felina G (indicata dalla freccia): osserviamo che a fronte di un'elevata disponibilità di spazio (18,2 m<sup>2</sup>/gatto, 802 m<sup>2</sup> complessivi) i valori di cortisolo tendono a crescere a causa di instabilità sociale e variabilità territoriale.

Inoltre, sebbene i dati non mostrino una distribuzione sufficientemente normale, si è voluto valutare approssimativamente quanta della variabilità nei valori del cortisolo sia da attribuire alla variabilità spaziale. Per ottenere ciò si è operata una regressione. Tenendo conto della scarsa normalità dei dati, la variabilità dei valori del cortisolo è da imputare alla disponibilità di spazio approssimativamente per il 67%.

Il Test di correlazione a ranghi di Spearman ha fornito per il cortisolo:  $r_s = 0,477$ ,  $P = 0,000000$ ;  $N = 125$ .

Infine, si è voluto controllare se ciascuna coppia di valori adiacenti (cioè colonie adiacenti sul *continuum* di disponibilità spaziale) differisse significativamente nei valori di cortisolo. Si è quindi applicato il Test ad U di Mann-Whitney, con i risultati illustrati nel grafico 26 (medie  $\pm$  S.E.; gli asterischi indicano: \* =  $P < 0,05$ , \*\* =  $P < 0,01$ ).



**Grafico 26:** Applicazione del Test di Mann-Whitney per controllare la differenza nei valori del cortisolo per ciascuna coppia di valori adiacenti.

In dettaglio, i risultati del test sono riportati nella tabella sottostante.

	m <sup>2</sup> /gatto	m <sup>2</sup>		CORTISOLO
<b>OASI F vs OASI M</b>	2,65 vs 6,10	94,3 vs 610	n <sub>1</sub> =25 n <sub>2</sub> =31	U=249 P=0,0225
<b>OASI M vs OASI C</b>	6,10 vs 8,52	610 vs 658	n <sub>1</sub> =25 n <sub>2</sub> =43	U=535 n.s.
<b>OASI C vs OASI PC</b>	8,52 vs 67	658 vs 2410	n <sub>1</sub> =16 n <sub>2</sub> =43	U=147 P=0,0008
<b>OASI PC vs OASI PM</b>	67 vs 100	2410 vs 4000	n <sub>1</sub> =10 n <sub>2</sub> =16	U=68 n.s.

**Tabella 10:** Risultati ottenuti dall'applicazione del Test ad U di Mann-Whitney per controllare la differenza nei valori di cortisolo per ciascuna coppia di valori adiacenti.

Pur tenendo conto dei limiti posti dalle differenze di numerosità presenti in alcuni confronti (e.g. OASI C vs OASI PC = 43 vs 16) che parzialmente indeboliscono i test, tuttavia, è chiaro che le differenze significative nei valori di cortisolo si riscontrano quando si confrontano situazioni con disponibilità spaziali molto diverse, da 2,65 a 6,10 e da 8,52 a 67 m<sup>2</sup>/gatto.

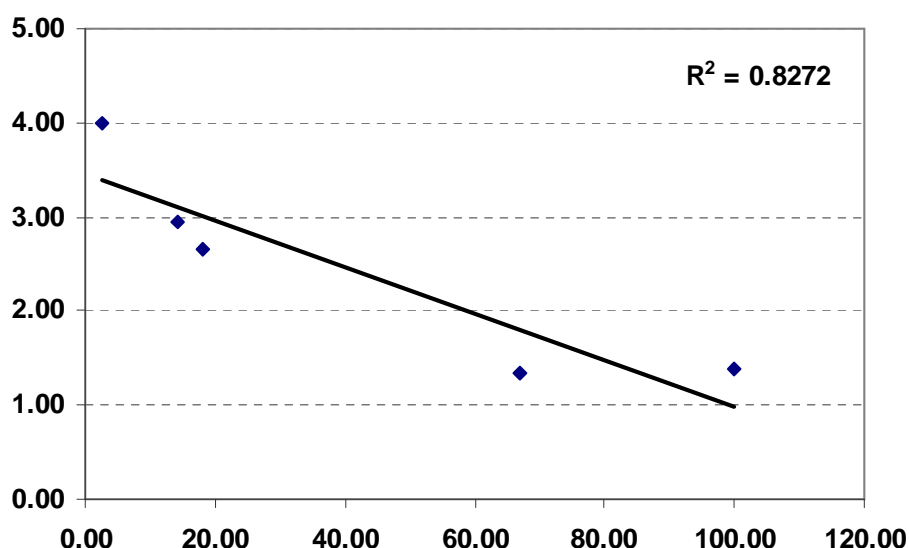
### STEROIDI NEL PELO

I test di determinazione del cortisolo sono stati ripetuti per il pelo, anche in ragione del fatto che nella colonia P non è stato possibile campionare le feci. Sono stati utilizzati solo i valori relativi al secondo prelievo perché quelli relativi al primo erano riferibili al periodo antecedente allo studio, e quindi sconosciuto. Anche in questo caso non è sempre stato possibile saggiare tutte le colonie insieme, a causa del fattore

confondente rappresentato dalla stagionalità che ha influenzato i valori in almeno due colonie.

Infatti, per quanto riguarda il cortisolo, sono state saggiate insieme 5 colonie: F, G, P, PC, PM mentre, M e C sono state escluse dall'analisi. In M il secondo taglio di pelo è stato praticato all'inizio di agosto ed il cortisolo accumulatosi era riferibile al periodo di minima produzione; mentre in C esso è stato effettuato dopo ben 8 mesi di crescita, e la quantità così accumulata non era confrontabile con quella degli altri gruppi (max. 3 mesi di crescita).

E' stato comunque trovato un andamento lineare evidenziato dalla relazione negativa tra cortisolo prodotto e disponibilità di spazio, come illustrato dal grafico 27 sottostante.

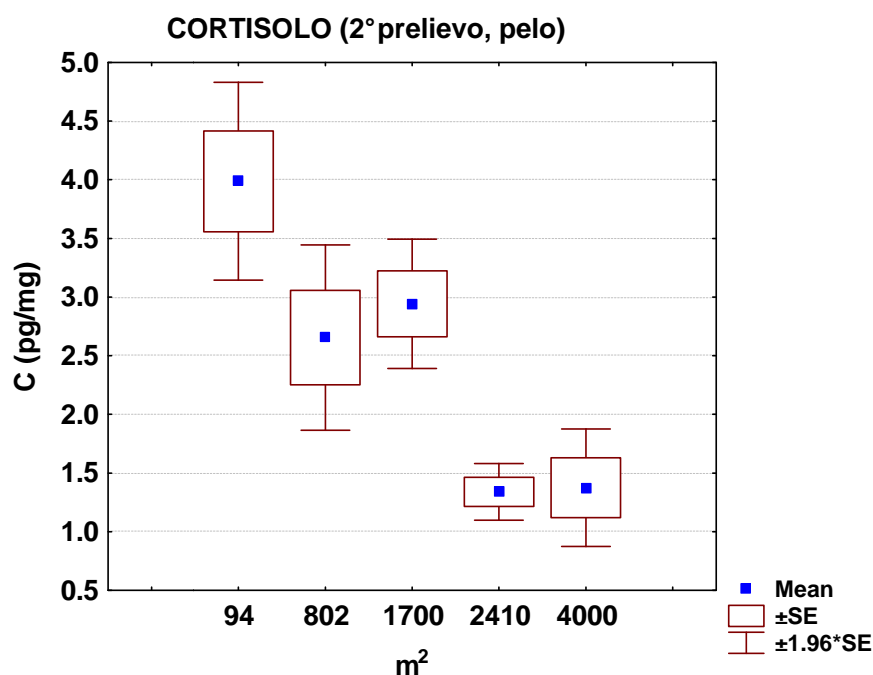


**Grafico 27:** Il grafico mostra l'andamento lineare evidenziato dalla relazione negativa tra cortisolo prodotto e disponibilità di spazio.

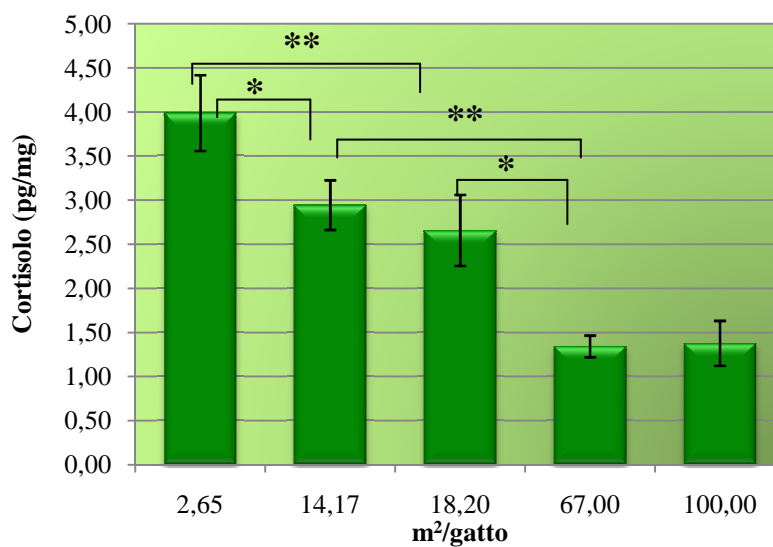
Il coefficiente di determinazione attribuisce l'83% della variabilità del cortisolo alla disponibilità di spazio. Introducendo i valori di C e M, l' $R^2$  si abbassa a  $R^2=0,4$ , ma il coefficiente di correlazione a ranghi di Spearman per tutte e 7 le colonie dà comunque conto dell'associazione negativa con  $P=0,00004$  ( $N=128$ ,  $r_s=-0,355$ ). Possiamo quindi concludere che in questi gattili si riscontra una relazione negativa significativa tra spazio disponibile e cortisolo, al di là di possibili piccole inversioni tra due colonie con disponibilità di spazio simile, dovute a svariati effetti locali, compreso quello stagionale.

Il confronto tra le diverse colonie, rivela che i valori sono significativamente diversi (Kruskal-Wallis ANOVA  $\chi^2$  per ranghi:  $P=0,0000$ ; Test della mediana:  $P=0,0000$ ). Il grafico 28 *box & whiskers* illustra valori medi, intervalli di errore standard

e di 1,96 l'errore standard; in ascissa è mostrata la disponibilità totale di spazio in ciascuna colonia.



**Grafico 28:** Nel presente grafico sono illustrati i valori medi di cortisolo, gli intervalli di errore standard e di 1,96 l'errore standard mentre in ascissa è mostrata la disponibilità di spazio nelle cinque colonie considerate.



**Grafico 29:** Medie del cortisolo nel pelo  $\pm$  SE e indicazione della significatività (asterischi) delle differenze tra coppie di valori adiacenti o rilevanti.

Il grafico 29 riporta medie  $\pm$  E.S. e indicazione della significatività (asterischi) delle differenze tra coppie di valori adiacenti o rilevanti, associati con il Test U di Mann-Whitney.



I risultati del test sono mostrati nella tabella 11.

	<b>m<sup>2</sup>/gatto</b>	<b>U</b>	<b>P</b>
<b>F vs P</b>	2,65 vs 14,17	164	0,013
<b>F vs G</b>	2,65 vs 18,20	94	0,007
<b>P vs G</b>	14,17 vs 18,20	203	n.s.
<b>G vs PC</b>	18,20 vs 67	108	0,0026
<b>P vs PC</b>	14,17 vs 67	78	0,000001
<b>PC vs PM</b>	67 vs 100	72	n.s.

**Tabella 11:** La tabella mostra i risultati del Test ad U di Mann-Whitney.

## COMPORTAMENTO

### SCANSIONI

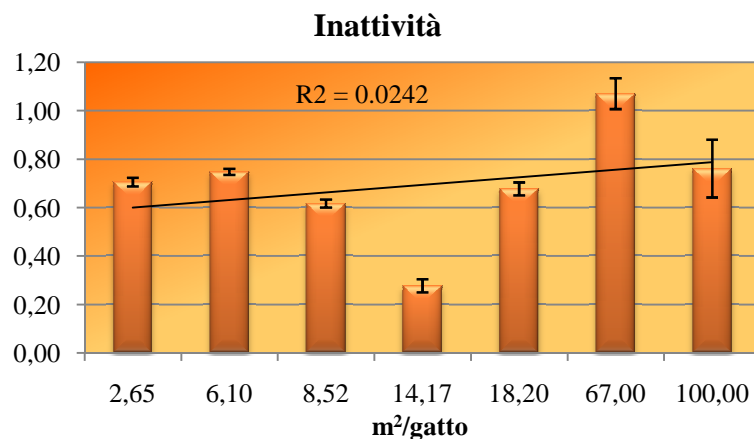
Sebbene il metodo di campionamento utilizzato e l'etogramma siano stati uguali in tutte le strutture studiate, emerge con evidenza che la presenza di peculiarità locali, legate tra l'altro alle conseguenze della disponibilità di spazio, hanno reso non tutti i dati comportamentali ugualmente confrontabili. Di ciò si dà conto nella trattazione dei risultati.

Le somme individuali dei *record* per ogni classe comportamentale sono state standardizzate sul numero totale di scansioni effettuate. Le frequenze così ottenute sono state poi descritte statisticamente, e dai valori medi  $\pm$  errore standard sono stati tratti i grafici che seguono che permettono una prima analisi visiva degli andamenti.

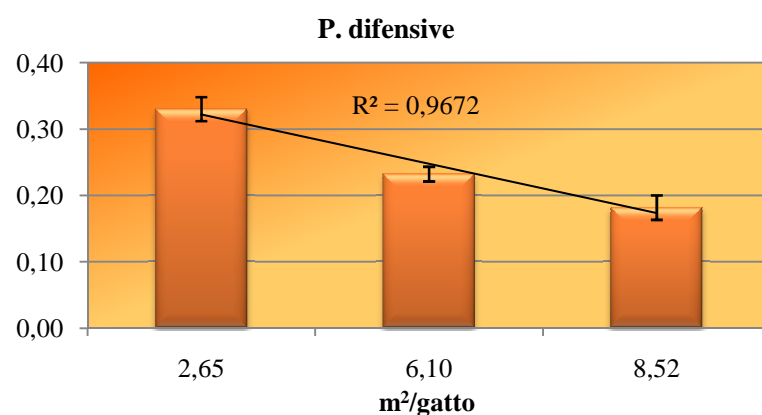
Come si vede dal grafico 30, l'inattività non ha mostrato un andamento netto in funzione dello spazio, probabilmente a causa dei diversi fattori locali (un'estate particolarmente torrida per la colonia M, un periodo di instabilità in G e P), ma la sua componente difensiva (grafico 31 e 32) variava visibilmente con lo spazio in modo diverso: diminuiva all'aumentare dello spazio disponibile quando questo era inferiore ai 10 m<sup>2</sup>/gatto (cioè finché il gattile conservava caratteristiche contenitive e difensive: F, M e C erano gattili ben recintati dai quali i gatti non potevano entrare od uscire). Il coefficiente di determinazione rende conto del 97% della variabilità nelle posture difensive con l'aumento di spazio pro-capite (grafico 31).

Quando però il gattile era non solo molto esteso ma anche aperto (e, di fatto, strutture molto estese finiscono con l'offrire comunque varchi), allora l'andamento risultava invertito, con un  $R^2=0,65$ . Altre analisi sarebbero necessarie per appurare se sia

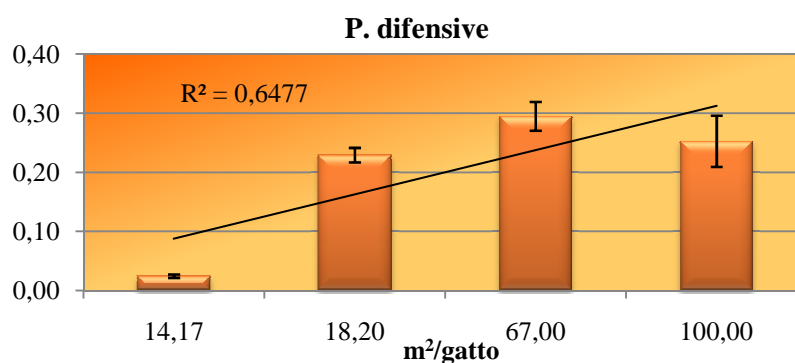
stata questa maggior esposizione oppure altri fattori a determinare questa tendenza (grafico 32).



**Grafico 30:** Descrizione della frequenza con cui compare il comportamento di INATTIVITA' mediante la valutazione dei valori medi e dell'errore standard.

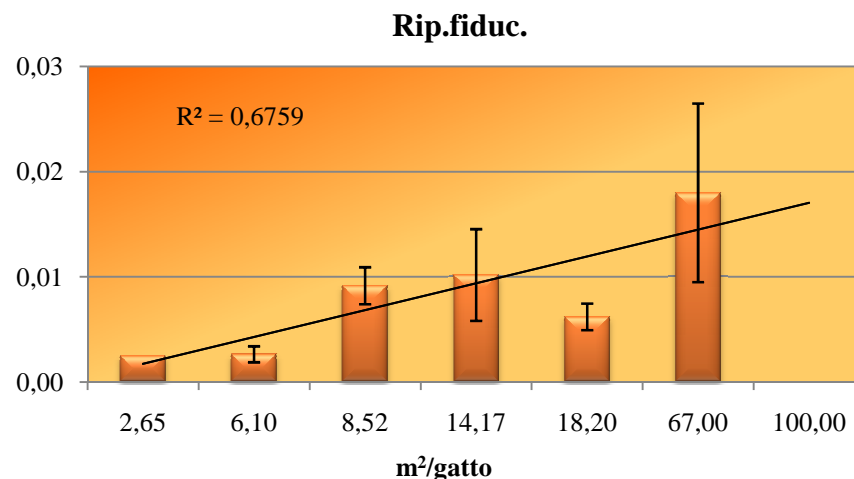


**Grafico 31:** Andamento delle POSTURE DIFENSIVE assunte dai soggetti in funzione dello spazio disponibile, osserviamo una diminuzione nell'assunzione di tali posture all'aumentare dello spazio disponibile quando questo non supera i 10m²/gatto cioè nelle oasi feline F, M e C.



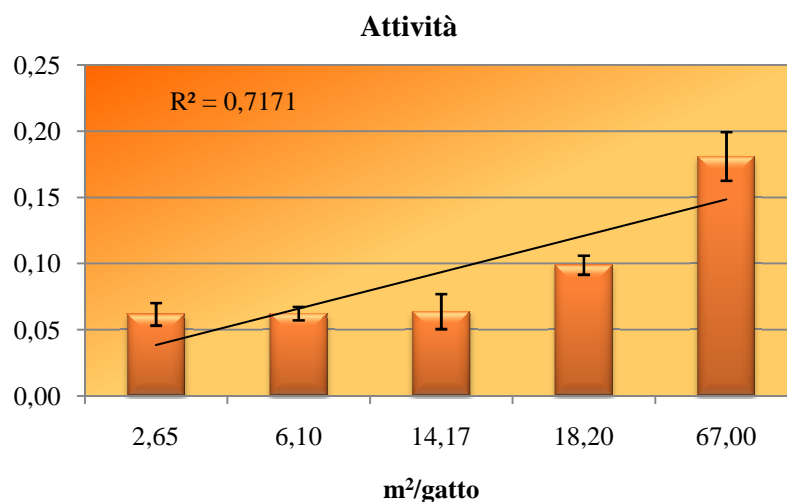
**Grafico 32:** Andamento delle POSTURE DIFENSIVE assunte dai soggetti in funzione dello spazio disponibile, osserviamo un andamento invertito rispetto al grafico 31 in ragione del fatto che abbiamo considerato oasi feline di maggiore estensione che avevano comunicazione con l'ambiente esterno (oasi P, G, PC e PM).

Anche il riposo fiducioso, in posture difensive, ha mostrato una netta relazione con la disponibilità di spazio e del tutto positiva (grafico 33). I dati esaminati non erano disponibili per la colonia PM, quindi solo 6 oasi sono state esaminate. Il coefficiente di determinazione rende conto del 68% della variabilità dell'uno con l'altro, sebbene l'errore standard sia piuttosto elevato a causa del basso numero di individui coinvolti.



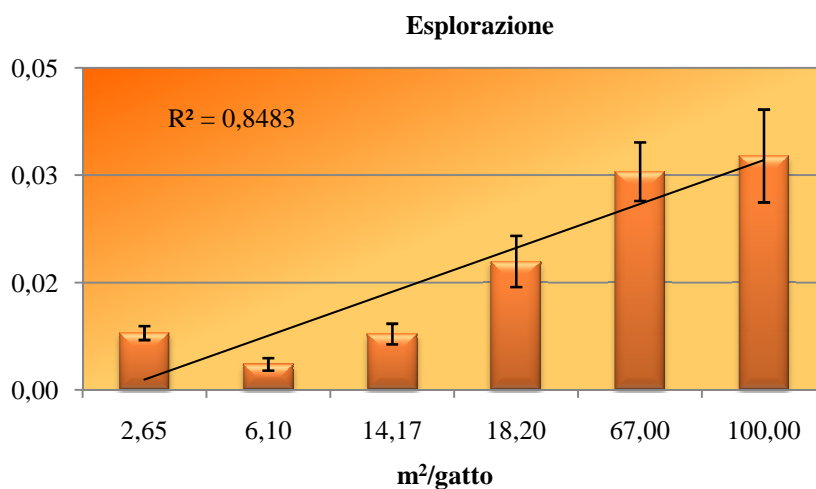
**Grafico 33.** Relazione positiva del comportamento di RIPOSO FIDUCIOSO in funzione della disponibilità di spazio in 6 oasi feline, è stata esclusa la colonia PM.

Anche per l'attività si è reso necessario selezionare le colonie: C è stata esclusa per una differenza di campionamento, PM perché la sua area recintata veniva utilizzata dai gatti quasi esclusivamente per il riposo ed il nutrimento avendo essa caratteristiche di totale apertura su un parco chiuso al pubblico (area militare) che introduceva un errore sistematico evidente nel campionamento dell'attività. L' $R^2$  per le restanti 5 colonie è risultato pari a 72 e l'andamento crescente con la disponibilità di spazio, secondo le attese (grafico 34).



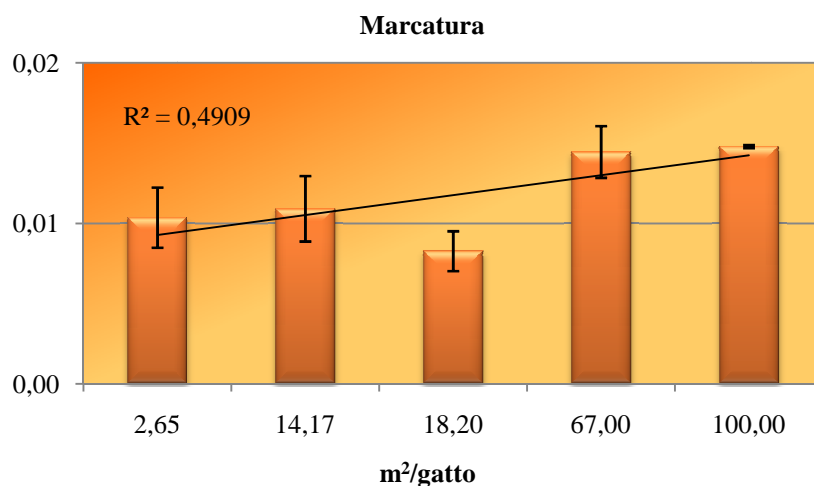
**Grafico 34:** L'ATTIVITA' mostra un andamento crescente all'aumentare dello spazio disponibile, sono state escluse da questa valutazione le oasi C e PM.

Anche l'esplorazione segue lo stesso andamento. Anche qui la colonia C è stata esclusa dall'analisi. Il coefficiente di determinazione spiega l'85% della co-variabilità (grafico 35).



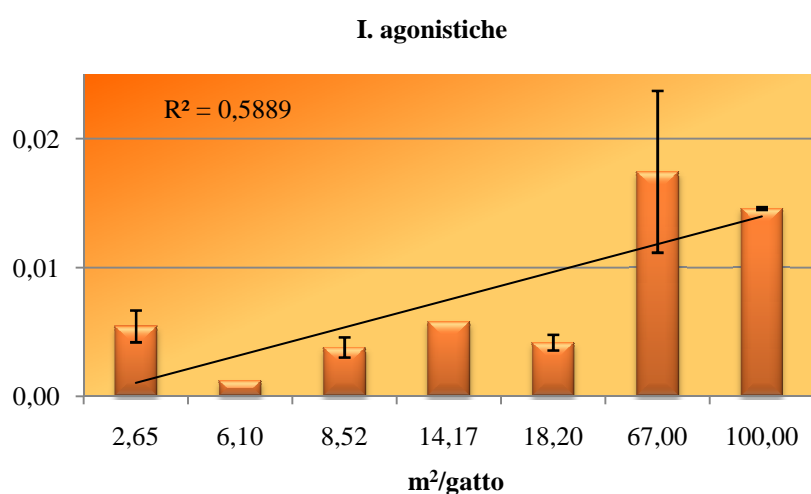
**Grafico 35:** Il comportamento di ESPLORAZIONE ha un andamento crescente all'aumentare dello spazio disponibile, è stata esclusa da questa valutazione la colonia C.

L'attività di marcatura ha mostrato un blando aumento all'aumentare dello spazio, ma con scarti locali, presumibilmente dovuti a fattori peculiari, come è da attendersi. Due colonie, C ed M, sono state escluse per le ragioni già menzionate. Il grafico 36 illustra la tendenza.



**Grafico 36:** Andamento dell'ATTIVITA' di MARCATURA che ha mostrato un blando aumento all'aumentare dello spazio, in questo caso sono state escluse dalla valutazione le colonie C ed M.

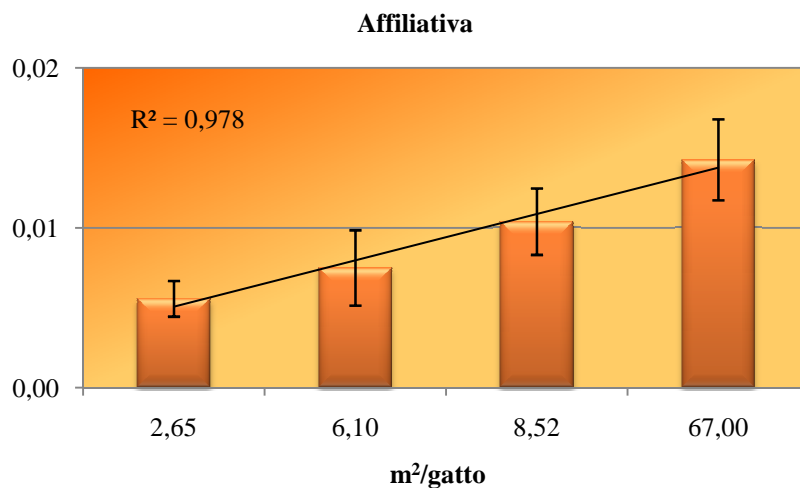
Anche la frequenza delle interazioni agonistiche ha mostrato un blando aumento in funzione dello spazio ( $R^2=,59$ ; grafico 37), ma con chiare tendenze locali, com'era da aspettarsi dato che la composizione del gruppo e la sua stabilità dovrebbero pesare come se non più della disponibilità spaziale.



**Grafico 37:** Andamento delle INTERAZIONI AGONISTICHE che ha mostrato un blando aumento in funzione dello spazio.

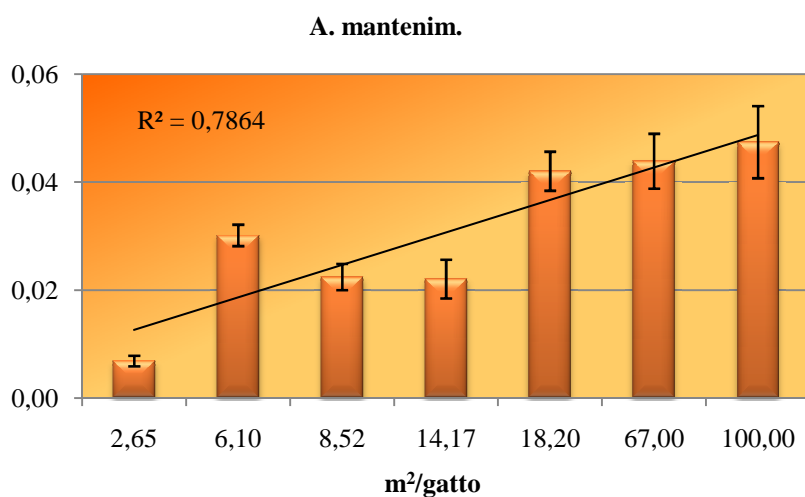
Per le interazioni affiliative si evidenzia un chiaro aumento all'aumentare dello spazio disponibile ( $R^2=0,98$ ; grafico 38), ma anche in questo caso è stato necessario escludere due colonie che hanno presentato picchi rispettivamente positivo (Oasi P) e negativo (Oasi G), il primo a carico di una coppia di gatti profondamente legata affettivamente che, scambiandosi di continuo *allorubbing*, innalzava la media del gruppo ma si presentava come valore estremo, il secondo dovuto alla già descritta elevatissima

instabilità del gruppo ospitato nella colonia G, che giocava a sfavore dei comportamenti affinitivi. La colonia PM non ha contribuito ai dati. La tendenza è stata del tutto in linea con le aspettative.



**Grafico 38:** Aumento delle interazioni AFFILIATIVE in funzione dello spazio. Sono state escluse dalle valutazioni le colonie P e G mentre la colonia PM non ha contribuito ai dati.

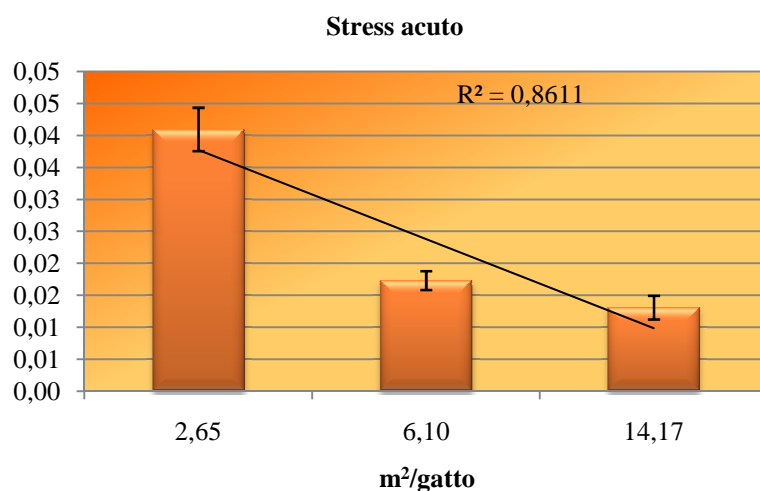
Le attività di mantenimento sono aumentate, secondo le aspettative, all'aumentare dello spazio. Il coefficiente di determinazione, pari a 0,79, suffraga quanto appare visibile ad un esame puramente grafico (grafico 39).



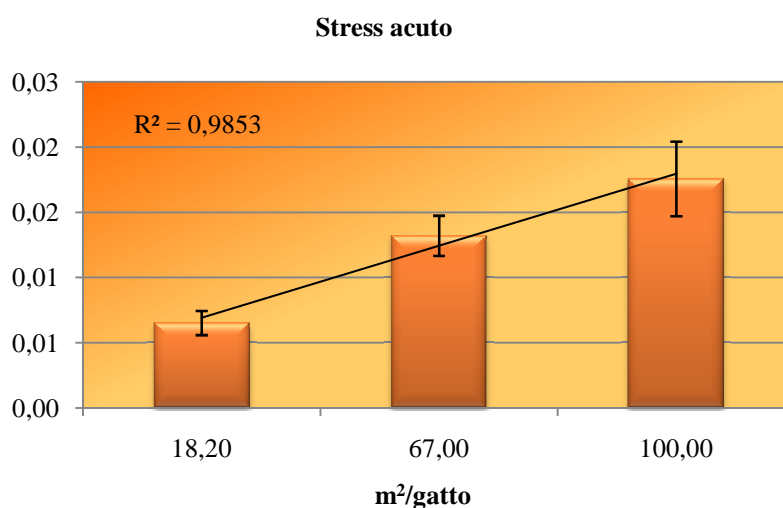
**Grafico 39:** Aumento delle ATTIVITA' di MANTENIMENTO in funzione dello spazio.

Per quanto riguarda gli indicatori comportamentali di stress, si nota un duplice andamento, secondo quanto già visto per le posture difensive. La diminuzione all'aumentare dello spazio è in linea con le aspettative (grafico 40;  $R^2=0,86$ ), mentre

l'innalzarsi con quest'ultimo nei gattili aperti (grafico 41;  $R^2=0,98$ ) è probabilmente da mettere nuovamente in relazione con quest'ultima caratteristica.



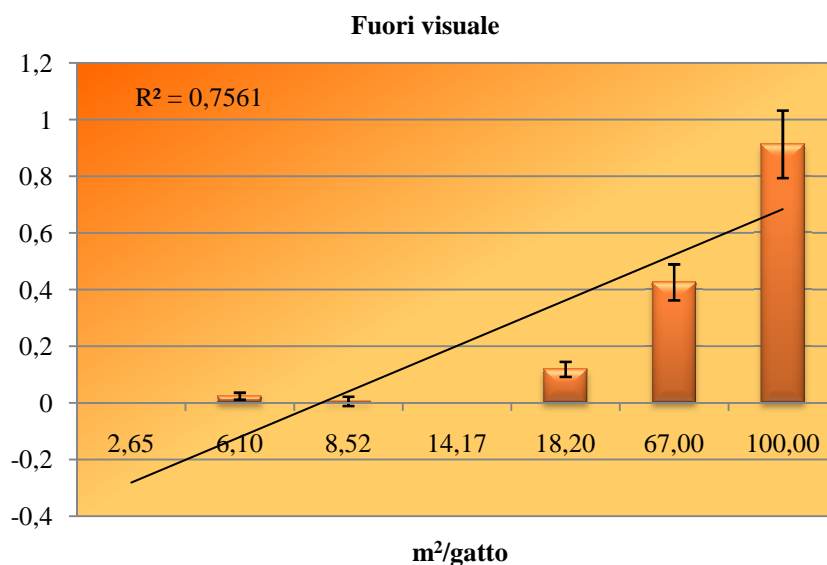
**Grafico 40:** Andamento degli INDICATORI COMPORTAMENTALI di STRESS: nelle colonie F, M e P osserviamo una diminuzione di questi comportamenti all'aumentare dello spazio.



**Grafico 41:** Andamento degli INDICATORI COMPORTAMENTALI di STRESS: nelle colonie G, PC e PM osserviamo un aumento di questi comportamenti all'aumentare dello spazio.

Infine, ma non ultimo per importanza, l'entità dello stare appartati, fuori dalla visuale dell'osservatore, cresceva ovviamente all'aumentare della disponibilità di spazio. Il grafico 42 illustra l'andamento ( $R^2=0,76$ ). Nel gattile più piccolo non era virtualmente possibile per i gatti nascondersi in maniera efficace. Il risultato, al di là della apparente banalità, è importante perché da studi paralleli appare evidente che i gatti tendono ad appartarsi quando ne hanno la possibilità e che il potersi appartare di frequente si accompagna a bassi livelli di cortisolo ed è positivamente correlato ad indicatori di

benessere e negativamente ad indicatori di stress acuto e cronico (Carloni E., dati non pubblicati).



**Grafico 42:** Valutazione dell'entità dello STARE APPARTATI che mostra un andamento crescente all'aumentare della disponibilità di spazio.

Per verificare gli andamenti descritti si è utilizzato il Test di correlazione a ranghi di Spearman tra le frequenze comportamentali e lo spazio disponibile pro-capite.

I risultati, in linea con quanto descritto in precedenza, sono raccolti nella tabella che segue (tabella 12).

COMPORTAMENTI	N	$r_s$	$P$
INATTIVITA'	269	0,131	0,032
POSTURE DIFENSIVE	114	-0,605	0,000000
	138	0,546	0,000000
RIPOSO FIDUCIOSO	64	0,503	0,00002
ATTIVITA'	203	0,446	0,000000
ESPLORAZIONE	141	0,636	0,000000
MARCATURA	94	0,329	0,001202
AFFILIATIVI	70	0,325	0,006010
MANTENIMENTO	241	0,454	0,000000
STRESS ACUTO	97	-0,670	0,000000
	42	0,713	0,000000
APPARTARSI	161	0,799	0,000000

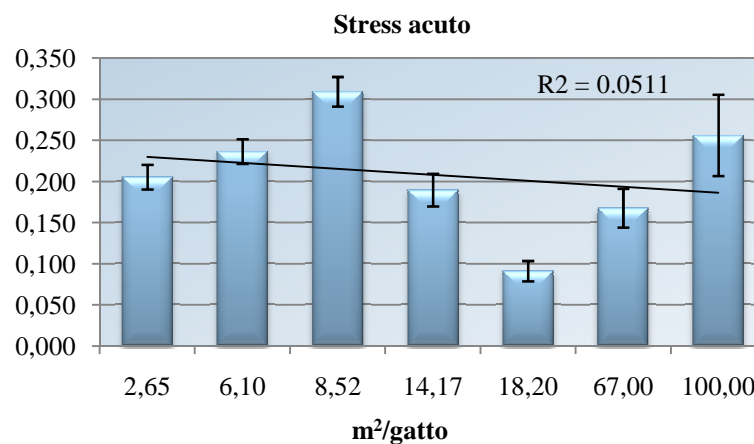
**Tabella 12:** Riassunto dei risultati ottenuti in linea con quanto descritto in precedenza.



*FOCALI*

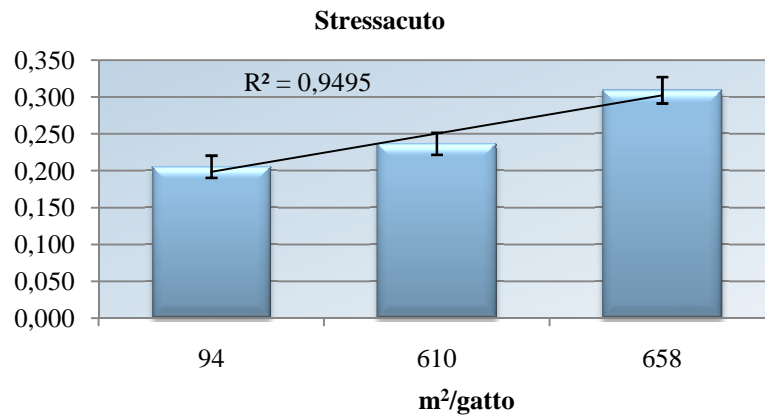
Anche per i record così ottenuti è stato necessario escludere a volte alcune colonie, a causa di piccole differenze nella campionatura, di peculiarità di alcuni soggetti o per altri motivi legati a cause locali (struttura, visibilità, ecc.).

Gli indicatori comportamentali di stress acuto, contro le aspettative, non mostrano di variare con la disponibilità di spazio quanto previsto. Il grafico 43 illustra medie  $\pm$  E.S., e fornisce indicazione del debole andamento e del coefficiente di determinazione (pari a 0,05). Il test di correlazione a ranghi di Spearman conferma la relazione negativa con un  $r_s = -0,298$ , per un  $P = 0,000002$  ( $N = 248$ ).

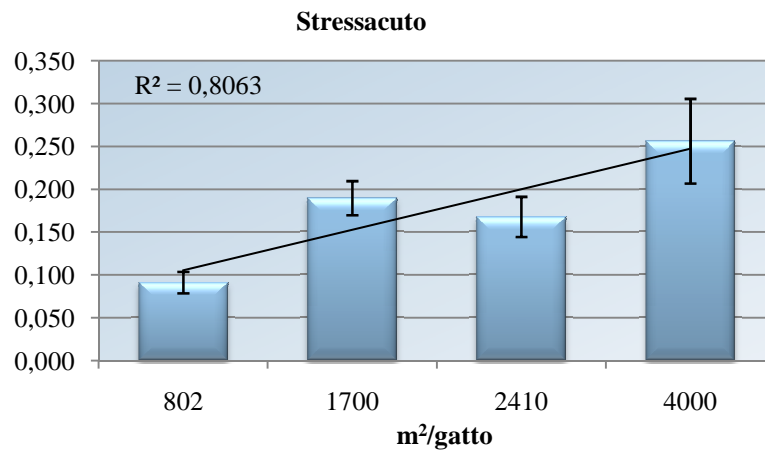


**Grafico 43:** Gli indicatori di stress acuto non mostrano di variare con la disponibilità di spazio quanto previsto, il grafico fornisce indicazioni del debole andamento ed illustra medie  $\pm$  SE.

Quando però si dividono i dati, da una parte le colonie a disponibilità di spazio pro-capite inferiore a 10 m<sup>2</sup>, dall'altra quelle a disponibilità superiore, si vede che in entrambi i casi la tendenza è di un aumento delle frequenze all'aumentare dello spazio. I grafici 44 e 45 mostrano questo andamento, distribuendo però i dati in base alla metratura complessiva dei gattili (ascissa), onde evitare l'inversione tra le colonie G e P, che, a fronte di una disponibilità pro-capite di 18.20 e 14.17 rispettivamente, erano però di 802 vs 1700 m<sup>2</sup> complessivi. Il coefficiente di determinazione è in entrambi i casi molto elevato, spiegando rispettivamente il 95 e l'81% della variabilità. Il coefficiente di correlazione a ranghi di Spearman conferma la tendenza nel primo caso con  $P = 0,000007$  ( $r_s = 0,398$ ,  $N = 120$ ), ma non nel secondo ( $r_s = 0,018$ ,  $N = 128$ , n.s.).

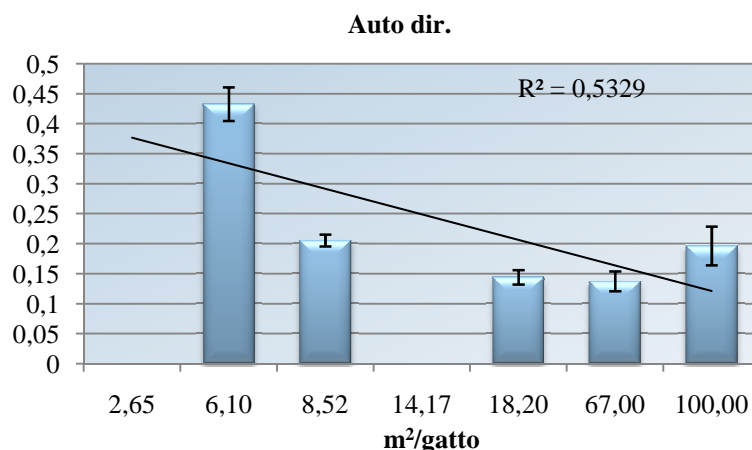


**Grafico 44:** Andamento degli indicatori di stress acuto in colonie con disponibilità di spazio pro-capite inferiore a 10 m².



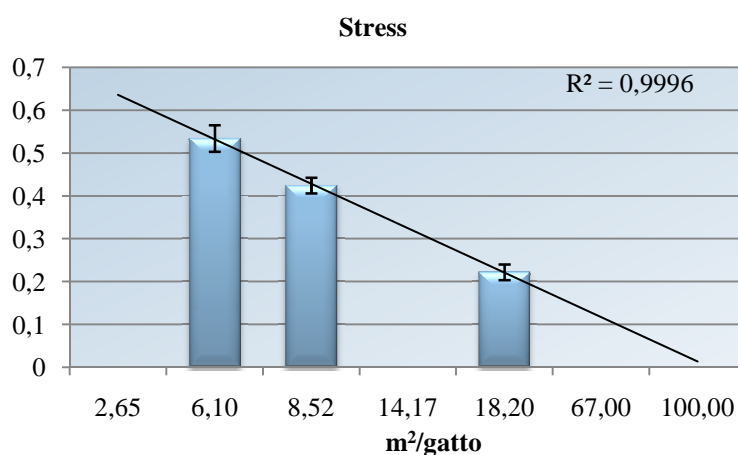
**Grafico 45:** Andamento degli indicatori di stress acuto in colonie con disponibilità di spazio pro-capite superiore a 10 m² .

Al contrario, e secondo le attese, le frequenze dei comportamenti auto-diretti diminuivano con l'aumentare dello spazio disponibile (grafico 46; dati disponibili per sole 5 colonie). Secondo il test di Spearman la tendenza era altamente significativa, con un  $r_s = -0,588$ , per un  $P = 0,000000$  ( $N = 178$ ).



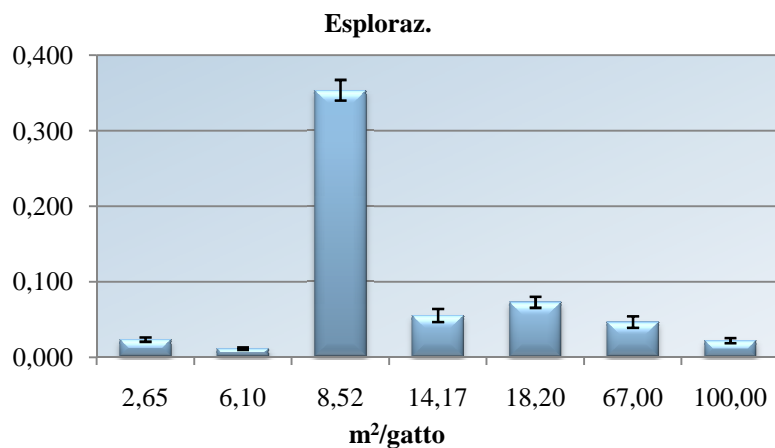
**Grafico 46:** Frequenze dei comportamenti auto-diretti che diminuiscono all'aumentare dello spazio disponibile (sono state prese in considerazione solo 5 colonie).

La stessa tendenza si riscontra quando agli indicatori acuti di stress ed ai comportamenti auto-diretti si sommano altri segni di nervosismo, quali i movimenti nervosi della coda e il *pacing* (dati disponibili per sole 3 colonie: grafico 47). L'analisi con il test di Spearman conferma le indicazioni fornite dal coefficiente di determinazione (99%):  $r_s = -0,681$ ,  $P = 0,000000$  ( $N = 130$ ).

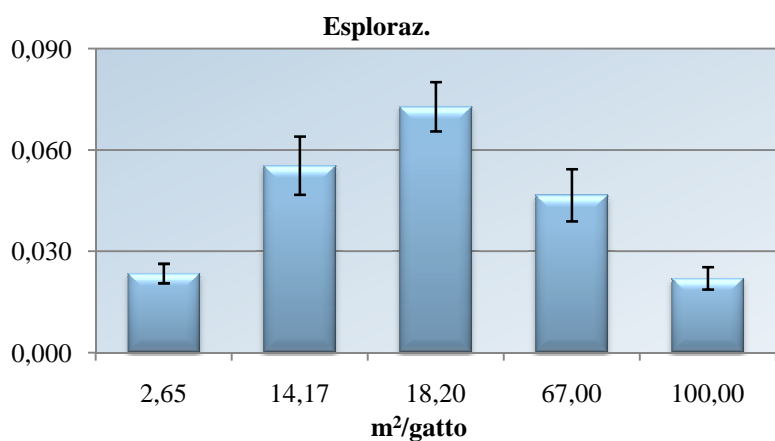


**Grafico 47:** Tendenza che si riscontra quando agli indicatori acuti di stress ed ai comportamenti auto-diretti si sommano altri segni di nervosismo (dati riguardanti 3 colonie).

L'analisi dell'attività di esplorazione rivela un picco positivo per la colonia C ed uno negativo per la M, estremi causati da situazioni locali peculiari (grafico 48). Eliminando gli apporti di queste (grafico 49) si nota comunque un andamento a campana, che fa sospettare che il principale determinante di questo comportamento non sia la disponibilità spaziale.

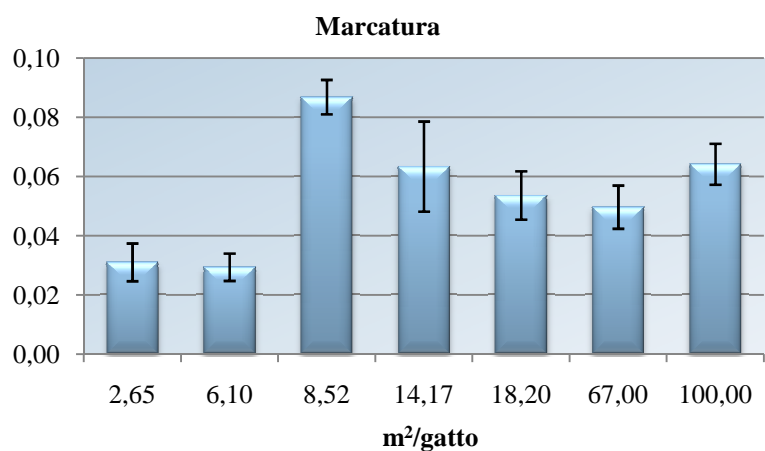


**Grafico 48:** Analisi dell'attività di esplorazione che rivela un picco positivo per la colonia C ed uno negativo per la M a causa di situazioni locali peculiari.



**Grafico 49:** Analisi dell'attività di esplorazione in seguito ad eliminazione delle colonie C ed M. Si noti l'andamento a campana.

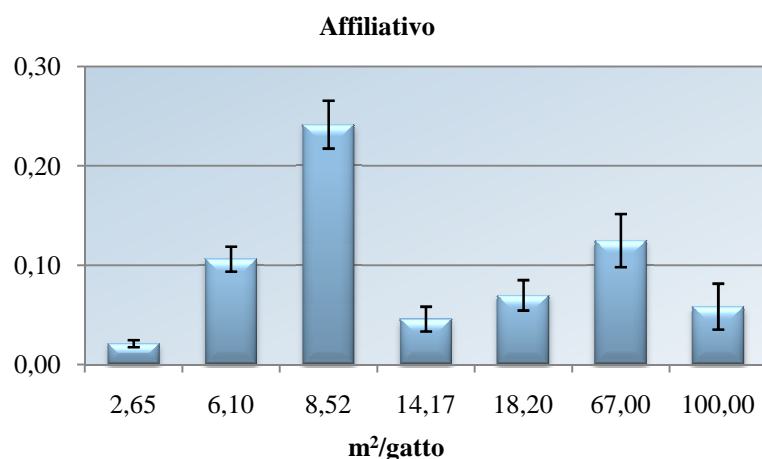
Lo stesso dicasi per la marcatura (grafico 50).



**Grafico 50:** Andamento dei comportamenti di marcatura.

Le discrepanze tra gli andamenti estratti dai dati campionati con tecniche diverse riflettono la diversa influenza di queste ultime. Alcuni comportamenti sono più fedelmente e più agevolmente campionati con la tecnica a scansione (posture, inattività, locomozione), altre con la tecnica a focale.

Esaminando le frequenze dei comportamenti affiliativi, riscontriamo lo stesso andamento visto per alcuni comportamenti campionati a scansione e cioè una netta divisione tra le colonie con meno di 10 m<sup>2</sup> disponibili per gatto e le altre (grafico 51).

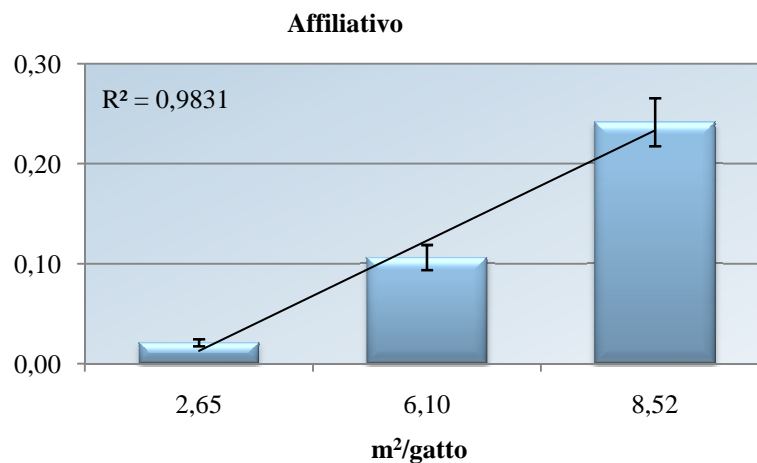


**Grafico 51:** Frequenze dei comportamenti affiliativi nelle sette colonie feline.

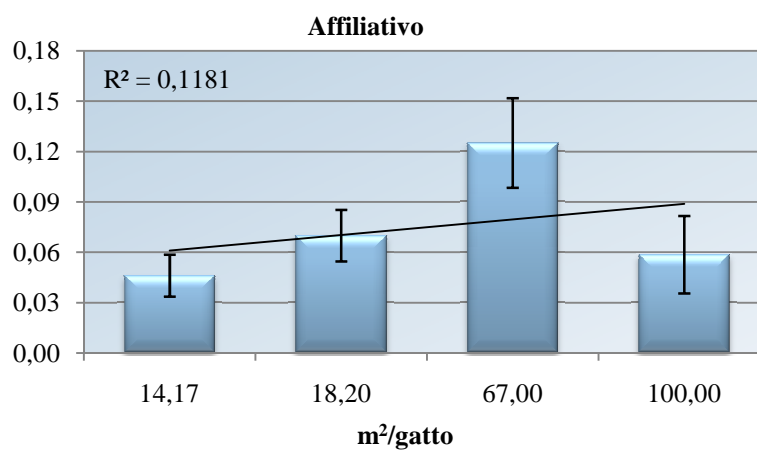
Dividendo il grafico, otteniamo i grafici 52 e 53.

Nelle colonie più affollate (con meno di 10 m<sup>2</sup> disponibili per gatto) l'andamento è nettissimo: si registra un chiaro aumento delle attività affiliative all'aumentare dello spazio disponibile ( $r^2=0,98$ ;  $r_s=0,757$ ,  $P=0,000000$ ,  $N=104$ ).

Quando però lo spazio disponibile era maggiore, e quindi i gatti avevano la possibilità di disperdersi distribuendosi sull'area, tale andamento era molto meno netto, e maggiormente dipendente da fattori locali, quali relazioni di amicizia o di parentela tra alcuni soggetti, la disposizione dei punti cibo o di altre risorse capaci di aggregare i gatti, ecc. Il test di Spearman conferma quanto visibile graficamente, e cioè:  $r_s=0,216$ ,  $P=0,033$ ,  $N=98$ .

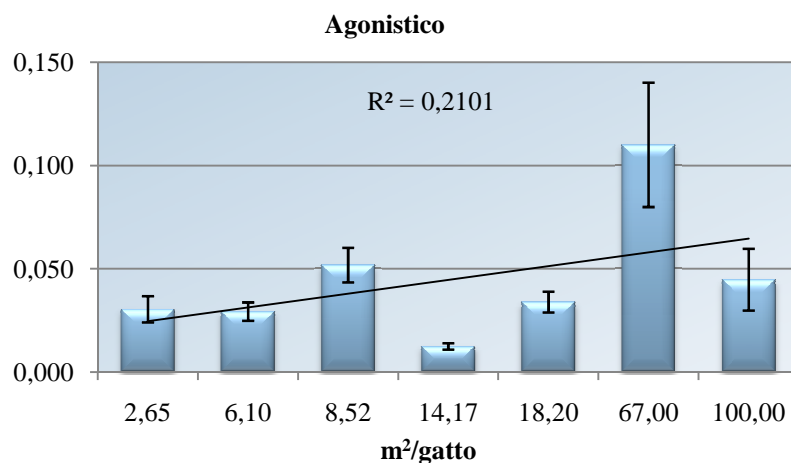


**Grafico 52:** Andamento dei comportamenti affiliativi nelle colonie più affollate (meno di 10 m<sup>2</sup> pro-capite disponibili); osserviamo un aumento dei comportamenti all'aumentare dello spazio disponibile.

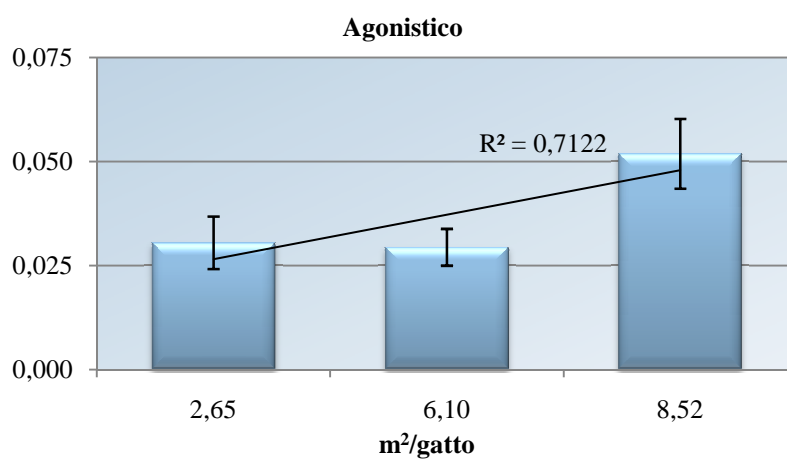


**Grafico 53:** Andamento dei comportamenti affiliativi nelle colonie che avevano a disposizione spazi maggiori.

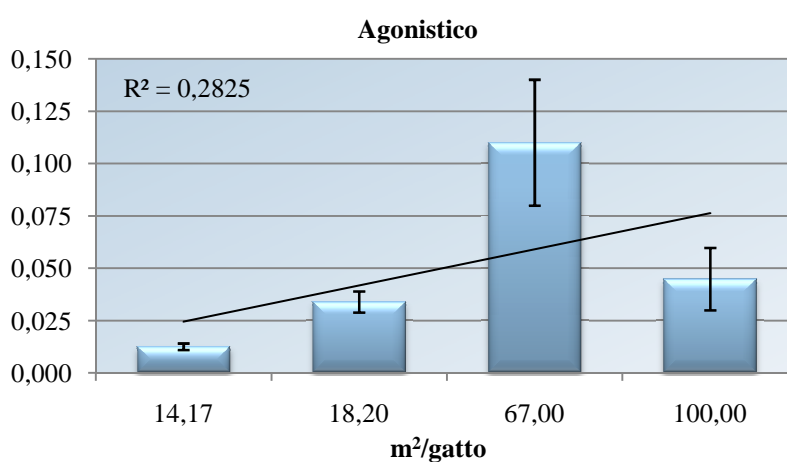
Più o meno lo stesso andamento emerge analizzando le interazioni agonistiche (grafici 54, 55 e 56). La correlazione agonismo-spazio è significativa sia nelle colonie affollate ( $r_s=0,222$ ,  $P=0,031$ ,  $N=94$ ), sia in quelle più vaste ( $r_s=0,521$ ,  $P=0,000002$ ,  $N=74$ ).



**Grafico 54:** Andamento dei comportamenti agonistici nelle sette colonie feline.



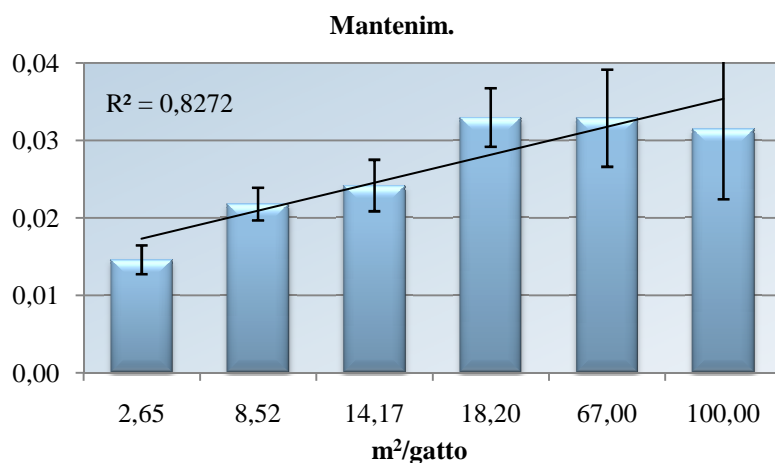
**Grafico 55:** Andamento dei comportamenti agonistici nelle oasi con disponibilità di spazio pro-capite inferiore a 10 m².



**Grafico 56:** Andamento dei comportamenti agonistici nelle oasi con disponibilità di spazio pro-capite superiore a 10 m².

L'andamento pare andare contro le aspettative, in quanto si presume che maggiore è lo spazio, minori sono le occasioni di incontro/scontro e minori sono anche le ragioni di scontro. Tuttavia, va detto che qui viene mostrata l'attività agonistica globale; se si esamina, invece, la sua frazione più seria, scontri ad alto livello di tensione, con disparità di rango tra i contendenti o meno, si ottiene un andamento ben diverso: questi scontri costituiscono la maggioranza nelle colonie più piccole e un'assoluta minoranza in quelle più grandi. I dati non sono tuttavia analizzabili perché troppo rari ed a carico di pochi soggetti.

Infine, le attività di mantenimento (grafico 57 riguardante 6 colonie) sono più frequenti quanto maggiore è lo spazio disponibile ( $r_s=0,334$ ,  $P=0,000026$ ,  $N=152$ ).



**Grafico 57:** Andamento delle attività di mantenimento analizzato in 6 colonie feline.



## CONCLUSIONI

Il gatto è una specie interessante per lo studio dello stress sociale e dei suoi meccanismi di regolazione in quanto si caratterizza per la notevole flessibilità sociale.

Questi aspetti sono stati fino ad oggi poco valutati pur presentando una notevole importanza nella determinazione dello stato di benessere dei gatti ospitati presso gattili.

Nell'esperimento 1 abbiamo analizzato i fattori di stress psicosociale, confrontando osservazioni comportamentali e livelli ormonali. I risultati hanno messo in evidenza che un'elevata attività di marcatura feromonale è associata a bassi livelli di cortisolo e che il livello generale di attività dei gatti ed i comportamenti affiliativi si accompagnano a loro volta a bassi livelli di cortisolo.

Sulla base di questi risultati, nell'esperimento 2 abbiamo voluto approfondire il ruolo della marcatura visivo-feromonale. Si è partiti dall'ipotesi sperimentale che la rimozione delle postazioni di marcatura visivo-feromonale (graffiatoi e spazzole) inducesse un aumento dei comportamenti legati allo stress e una diminuzione delle attività associate positivamente allo stato di benessere.

I risultati dell'analisi congiunta del comportamento e delle concentrazioni ormonali nei campioni di feci e di pelo hanno confermato l'ipotesi sperimentale.

Più precisamente si può concludere che la disponibilità di postazioni di marcatura visivo-feromonale ha un effetto positivo sia sugli indicatori comportamentali, sia su quelli ormonali di stress.

In particolare, in seguito alla riduzione della possibilità di marcatura, evenienza che si è verificata in conseguenza della rimozione delle postazioni di marcatura visivo-feromonale, si è registrato un aumento dei comportamenti che in letteratura sono considerati *markers* di stress quali: lo scuotimento capo-corpo-arto, lo *skin roll*, l'*oral behaviour* e il grattamento.

Si è osservata, inoltre, una riduzione dei comportamenti di benessere quali: il gioco solitario, il "fare le fusa" e il "fare la pasta".

Per quanto riguarda gli indicatori ormonali di stress si è osservato un parallelo aumento delle concentrazioni nelle feci e nel pelo del cortisolo.

Pertanto, questi risultati possono sicuramente dare utili suggerimenti per la gestione e la cura di gatti ospitati in gattili e/o gatti di proprietà, al fine di migliorarne le condizioni di benessere.

Nell'esperimento 3 è stato eseguito un confronto tra oasi feline di diversa estensione spaziale. I risultati dell'analisi delle concentrazioni di cortisolo nei campioni di feci e di pelo hanno permesso di evidenziare un aumento dello stesso correlato negativamente allo spazio disponibile. I risultati ottenuti potrebbero fornire spunti per analizzare dettagliatamente questo aspetto.

Altro fenomeno che abbiamo messo in evidenza in una colonia che presentava svariate anomalie (OASI G), legate ad instabilità sociale ed a variabilità territoriale, è che il cortisolo può presentare valori elevati nonostante le notevoli disponibilità di spazio, a causa dello stress a cui gli animali vengono sottoposti in seguito a frequenti cambiamenti nel gruppo sociale di appartenenza o nell'ambiente di ricovero. Da ciò possiamo evincere che lo spazio disponibile non è l'unico fattore da prendere in considerazione al fine di ottenere il benessere animale.

Analizzando i dati comportamentali si è visto come atteggiamenti di riposo fiducioso, così come comportamenti di esplorazione, attività, interazioni affiliative ed attività di mantenimento, tendano ad aumentare man mano che aumentano i metri quadrati a disposizione dei soggetti.

E' stato messo in evidenza un fenomeno molto importante: per quanto riguarda le posture difensive e gli indicatori comportamentali di stress, questi hanno assunto un andamento duplice. Nelle colonie con disponibilità di spazio limitata e che non fornivano ai gatti possibilità di interazione con l'ambiente esterno, la frequenza di questi comportamenti diminuiva all'aumentare dello spazio pro-capite, mentre, per colonie molto estese, che presentavano varchi che permettevano ai gatti l'interazione con l'ambiente esterno, la frequenza di tali comportamenti aumentava proporzionalmente allo spazio. Tutto ciò non deve fuorviarci nelle conclusioni, infatti, non dobbiamo dimenticare i dati ormonali. Il cortisolo nelle feci tende a diminuire all'aumentare dello spazio, quindi, i gatti che vivono in oasi di dimensioni maggiori sono "meno stressati"; il fatto però che spesso le oasi di dimensioni più rilevanti siano anche quelle che forniscono le maggiori possibilità di interazione con l'ambiente esterno, induce i soggetti ad adottare una serie di contromisure quali l'essere più vigili ed attenti, il che si evidenzia con l'andamento appena descritto.

Infine, si è potuto constatare come anche lo "stare appartati", aumenti proporzionalmente con l'aumentare dello spazio. Questo comportamento risulta essere molto importante in quanto mitiga lo stress ed è da prendere in considerazione nell'allestimento di strutture per ricovero per gatti. Infatti, nelle colonie di dimensioni

ridotte dove lo stress è già alto, l'impossibilità dei soggetti di appartarsi può contribuire a peggiorare la situazione; ecco perché si dovrebbero creare luoghi "artificiali" per fornire ai gatti la possibilità di appartarsi, magari sfruttando gli spazi sopraelevati (tetti, alberi, ecc.).

# CANI

Il rapporto che l'uomo ha instaurato con il cane ha subito, nel tempo, un'evidente evoluzione.

Si può ipotizzare che la prima funzione utile svolta dal cane sia stata quella di sentinella-avvisatrice: i cani selvatici/lupi avevano probabilmente cominciato a vivere intorno agli insediamenti umani cibandosi dei residui alimentari che trovavano nelle discariche (questa rappresentava un'utilità dal punto di vista igienico) e quando qualcuno (uomo o animale) si avvicinava, avvisavano che il territorio era stato "invaso".

Il passo successivo della coevoluzione delle due specie è stato quello di collaborare nella caccia ed, in seguito, nella sorveglianza degli armenti poiché, da cacciatore-raccoglitore, l'uomo stava diventando coltivatore e allevatore. Durante questo stretto rapporto con il cane, l'uomo ha attuato su tale specie un processo di selezione artificiale. Il criterio con cui erano scelti i soggetti che potevano accedere alla riproduzione e acquisire così la possibilità di trasmettere il loro corredo genetico alle generazioni successive, era quello di privilegiare i soggetti più efficaci nel lavoro.

Da compagno di caccia, il cane, è presto diventato compagno di vita e col passare dei secoli, e poi dei millenni, tale unione si è rinforzata fino ad arrivare ai giorni nostri in cui la collaborazione uomo-cane si dimostra ancora un binomio vincente. Si parla oggi di "cane da servizio", racchiudendo in questa definizione cani che adempiono ai ruoli più svariati: dalla ricerca di droga, armi ed esplosivi, alla protezione civile, dal salvataggio di persone disperse in macerie, valanghe ed acqua, ai cani guida per non vedenti.

Oggi il cane svolge, per lo più, un ruolo di tipo sociale: molta gente acquista o adotta un cane nella convinzione di vivere un'esperienza personalmente gratificante e che l'animale possa essere "compagno di vita", amico e protettore (Salmon e Salmon, 1983).

La maggiore popolarità degli animali da compagnia, purtroppo, però, coincide anche con un aumento del numero degli animali indesiderati, abbandonati, randagi o inselvaticiti. In base ai dati forniti dal Ministero della Salute relativi al Gennaio 2007, in Italia la popolazione canina di proprietà ammonterebbe a 5.349.150 e quella dei randagi a 690.512, di cui 229.444 sono ospitati nei canili.

La Legge n. 281 del 14 Agosto 1991 (Legge quadro in materia di animali di affezione e prevenzione del randagismo). stabilisce, tra le altre cose, che i cani vaganti,

catturati o comunque ricoverati presso i canili non possano essere sottoposti ad eutanasia, ma debbano essere gestiti in strutture idonee fino all'adozione; possono, infatti, essere soppressi solo se gravemente malati, incurabili o di comprovata pericolosità. Si è così determinata una condizione di reale emergenza a livello di ottemperanza della normativa vigente circa la ricezione e la gestione di un numero di cani sempre più elevato.

La conseguenza di quanto appena descritto è la detenzione di migliaia di animali in ricoveri spesso non ottimali nei quali non si garantisce loro un benessere concreto e razionale (Osella *et al.*, 2005).

Quindi, se da una parte c'è un aumento delle attenzioni e delle cure nei confronti degli animali dall'altra si arriva alla limitazione degli spazi e alla privazione di alcune esigenze etologiche della specie. L'animale deve poter fruire non soltanto di un buono stato di salute e di nutrizione, ma anche di una totale idoneità delle condizioni di detenzione. L'ambiente, per esempio, risulta essere un fattore che influenza enormemente il benessere del cane: i canili, gli allevamenti e i laboratori sono esempi di situazioni in cui le condizioni di vita possono essere austere e stressanti così come la costrizione domestica, i ritmi della famiglia mononucleare e le caratteristiche urbanistiche delle metropoli contemporanee.

Il cane è un animale sociale, con un'elevata comunicatività interspecifica e una forte motivazione all'esplorazione. Una vita monotona, la mancanza di stimoli e di controllo sull'ambiente può determinare, nel cane, apatia e depressione, nonché l'insorgenza o l'aggravarsi di problemi comportamentali.

Sulla base delle suddette informazioni gli obiettivi della seguente ricerca sono stati: evidenziare eventuali differenze dei livelli di cortisolo tra cani di proprietà e di canile, tra cani ospitati in diversi canili e tra cani che vivono in diverse realtà familiari (**esperimento 1**), fornire ai cani di canile un programma di arricchimento articolato e protratto nel tempo per poter identificare quali elementi distintivi di ogni rapporto cane-uomo (affetto, educazione e gioco) fossero più significativi per i cani (**esperimento 2**), valutare gli effetti di semplici forme di arricchimento ambientale (musica, giochi, interazione con l'uomo) in un gruppo di cani anziani (**esperimento 3**) ed, infine, valutare i "livelli di stress" a cui vengono sottoposti, durante l'addestramento, i cani guida per non vedenti (**esperimento 4**) e i cani utilizzati per discipline sportive come quelli da "utilità e difesa" (**esperimento 5**).

## ESPERIMENTO 1 – CONFRONTO TRA LE CONCENTRAZIONI DI CORTISOLO NEL PELO DI CANI DI PROPRIETÀ E DI CANILE

### SCOPI

Gli scopi della presente ricerca, condotta su cani ospitati da lungo tempo in canile e su cani di proprietà sono stati quelli di determinare i livelli fisiologici di cortisolo nel pelo ed evidenziare eventuali differenze dei livelli ormonali tra i cani di proprietà e quelli dei canili, tra i cani ospitati nei diversi canili ed, infine, tra i cani che vivono in diverse realtà familiari.

### MATERIALI E METODI

#### AMBIENTE DI STUDIO

Per la ricerca sono stati utilizzati cani di proprietà e cani ospitati da lungo tempo in 7 canili rifugio.

Tutti i canili sono gestiti da enti protezionistici e la loro capacità recettiva varia da 100 a 320 cani.

I canili sono simili per tipologia costruttiva, ma differiscono per le modalità di gestione degli animali. I cani sono ricoverati in boxes multipli composti da una parte coperta, parzialmente chiusa, e da un parquetto esterno. Il numero di cani per ciascun box varia da 2 a 8 in funzione delle dimensioni dei boxes, della taglia e dell'indole dei cani. I boxes sono dotati di un numero di cuccie pari al numero di animali presenti. I cani di 4 canili vengono portati, una volta al giorno, in zone erbose recintate dove interagiscono con conspecifici e con il personale mentre tale pratica non viene effettuata nei restanti canili.

L'alimentazione dei cani, ad eccezione di quelli affetti da specifiche patologie (es. diabete mellito), per i quali sono preparate diete appropriate, è di tipo secco; la somministrazione del cibo viene effettuata una volta al giorno. Gli animali hanno la possibilità di accedere liberamente, durante l'intera giornata, all'acqua di abbeverata contenuta in abbeveratoi posti all'interno del box in numero di uno ogni due cani. La pulizia del boxes viene effettuata una volta al giorno.

La gestione degli animali viene effettuata da dipendenti dell'Ente gestore, dei Comuni di appartenenza e da volontari.

I canili sono inoltre dotati, come previsto dalla normativa nazionale (legge n. 281 del 14 agosto 1991), di: locale per le operazioni di pulizia, lavaggio e disinfezione di materiali ed attrezzature, locale di cucina e di preparazione dei cibi, ambulatorio veterinario, reparto di infermeria per degenze temporanee, reparto di ricovero per cuccioli, reparto di isolamento per animali di nuova introduzione e per quelli affetti da malattie infettive e reparto per soggetti “asociali e tendenzialmente pericolosi”.

Gli animali di proprietà presentano un ambiente di vita molto vario (numero di uscite giornaliere, tipo di alimentazione, nucleo familiare ecc.). Abbiamo quindi ritenuto utile, per rendere tale “variabile” più simile all'ambiente “canile”, suddividere i soggetti in cani che vivono esclusivamente in appartamento, cani che vivono esclusivamente all'aperto (giardino o campagna) e cani che vivono sia in appartamento sia all'aperto.

### SOGGETTI DELLO STUDIO

Per la ricerca sono stati utilizzati 282 cani (182 di canili e 100 di proprietà) di età compresa tra 40 giorni e 18 anni. La maggior parte degli animali è rappresentata da meticcii (66%); tra i cani di razza prevalgono Labrador Retriever (6.9%), Siberian Husky e Setter (2.0%).

Nel 56% dei casi i cani sono risultati interi, nel restante 44% sterilizzati; in quest'ultimo caso l'intervento chirurgico era stato realizzato da almeno un anno.

Le caratteristiche dei cani utilizzati nella sperimentazione sono riportate in tabella 13.

	TOTALE	CANILI	PROPRIETÀ
<b>Totale cani (n°)</b>	282	182	100
<b>Maschi interi</b>	121	88	33
<b>Maschi sterilizzati</b>	37	31	6
<b>Femmine intere</b>	36	8	28
<b>Femmine sterilizzate</b>	88	63	25
<b>Età (anni)</b>	5.76 ± 0.21	6.08 ± 0.22	5.10 ± 0.45

**Tabella 13:** Caratteristiche dei cani utilizzati nella sperimentazione (media ± E.S.).

Gli animali scelti per la sperimentazione dovevano risultare sani alla visita clinica al fine di escludere i soggetti con patologie dismetaboliche, neurologiche o di altra natura che potessero alterare il risultato dei dosaggi ormonali.

I cani dei canili e quelli di proprietà sono stati identificati ed è stata delineata, ove possibile, la storia pregressa e le caratteristiche “comportamentali” di ogni individuo. Questa ricerca “anamnestica” è risultata particolarmente difficile per i cani ospitati nei canili rifugio in quanto gli animali hanno spesso provenienze sconosciute; i soggetti oggetto dello studio sono infatti cani abbandonati, randagi o ceduti dai proprietari per varie ragioni.



**Figura 24:** Cane di canile e cane di proprietà.

## RACCOLTA E TRATTAMENTO DEL MATERIALE BIOLOGICO

Gli animali dei canili e quelli di proprietà sono stati sottoposti a prelievo pelo che è stato raccolto dalla regione del garrese mediante rasatura effettuata con forbici, posto in buste di plastica a chiusura ermetica, identificato (soggetto, data, regione anatomica di prelievo) e conservato a temperatura ambiente.

Sui campioni di pelo sono state valutate le concentrazioni di cortisolo.

## METODI DI ANALISI

La determinazione della concentrazione di cortisolo è stata effettuata mediante le tecniche radioimmunologiche (RIA) precedentemente descritte.



## ANALISI STATISTICA

Al fine di evidenziare le eventuali differenze dei livelli di cortisolo nel pelo tra i cani ospitati nei diversi canili, tra i cani dei privati e tra le due categorie di animali è stata effettuata l'analisi della varianza. Mediante test di Duncan sono state calcolate le differenze minime significative.

Per l'esplorazione delle differenze fra i sessi è stato utilizzato il test U di Mann-Whitney.

Le differenze sono state considerate statisticamente significative per  $P < 0,05$ .

## RISULTATI E DISCUSSIONE

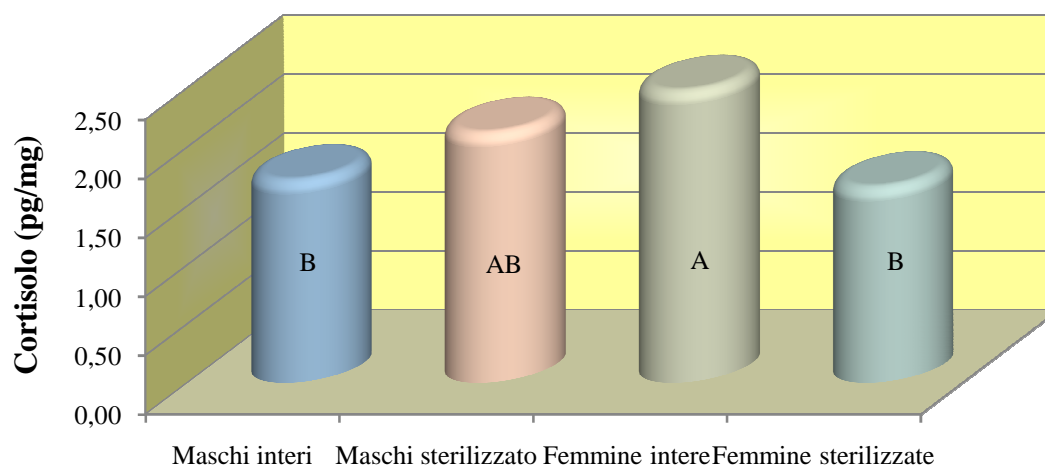
Da tutti i risultati, tranne quelli che si riferiscono all'età, per rendere i 2 gruppi più omogenei, sono stati esclusi 30 soggetti, di età inferiore ai 12 mesi, appartenenti al gruppo dei cani di proprietà.

Le concentrazioni medie di cortisolo rilevate nei cani, suddivisi per sesso, indipendentemente dalla loro origine (proprietà o canile), sono riportate nella tabella 14 e nel grafico 58.

I maggiori livelli di cortisolo nel pelo sono stati osservati nelle femmine intere; questo valore si discosta significativamente ( $P < 0,05$ ) da quelli osservati nei maschi interi e nelle femmine sterilizzate. Questo risultato è in accordo con quanto riportato in bibliografia da Buckingham *et al.*, (1999) ed è presumibilmente dovuto agli effetti degli ormoni sessuali (estrogeni e progesterone) sulla secrezione di glicocorticoidi. I minori livelli di cortisolo nel pelo, sono stati riscontrati nelle femmine sterilizzate.

<b>Pelo</b> <b>Cortisolo (pg/mg)</b>	<b>MASCHI</b>	<b>FEMMINE</b>
	<b>Media <math>\pm</math> E.S.</b>	<b>Media <math>\pm</math> E.S.</b>
<b>Interi</b>	1,71 $\pm$ 0,09	2,46 $\pm$ 0,38
<b>Sterilizzati</b>	2,11 $\pm$ 0,23	1,64 $\pm$ 0,11

**Tabella 14:** Concentrazioni di cortisolo rilevate nel pelo dei cani utilizzati per la ricerca suddivisi in base al sesso (media  $\pm$  E.S.).



**Grafico 58:** Concentrazioni di cortisolo nel pelo dei cani utilizzati per la ricerca suddivisi in base al sesso (media  $\pm$  E.S.). Lettere diverse (A, B) indicano differenze significative ( $P < 0,05$ ).

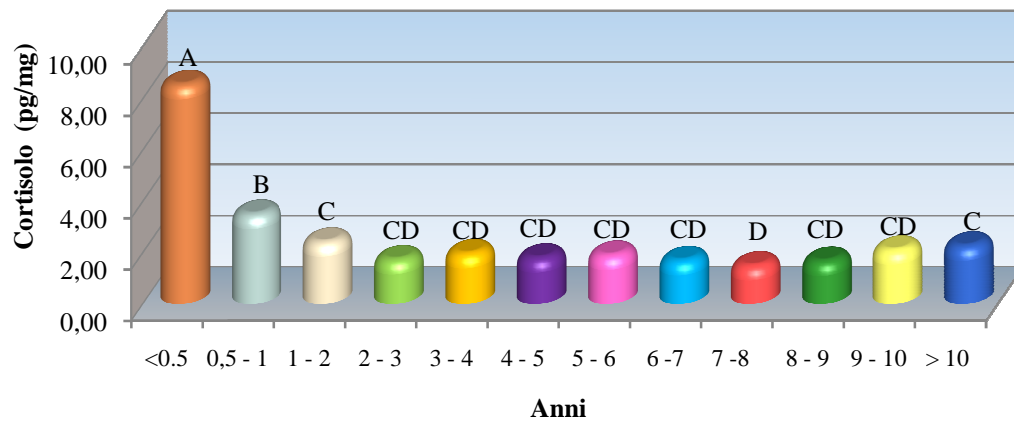
Le concentrazioni medie di cortisolo rilevate nei cani, suddivisi per età, indipendentemente dalla loro origine (proprietà o canile), sono riportate nella tabella 15, e nel grafico 59.

La concentrazione di cortisolo rilevata nel pelo mostra una significativa riduzione all'aumentare l'età dell'animale ( $P < 0,01$ )

E' interessante osservare che gli animali giovani presentano livelli di cortisolo nel pelo maggiori rispetto a quelli degli adulti.

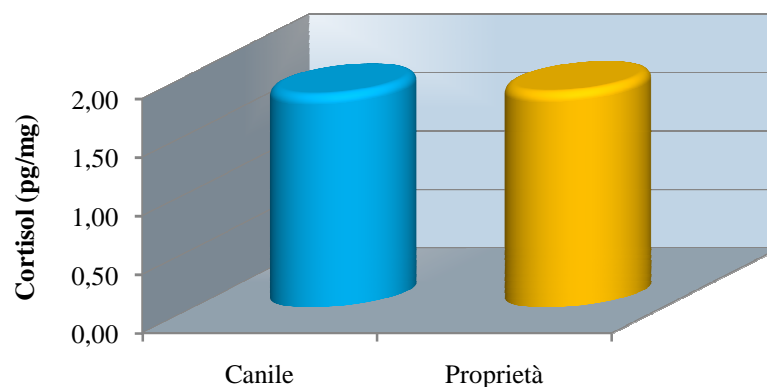
PELO	ETA' (anni)											
	0-0,5	0,5-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8	8-9	9-10	>10
	Media $\pm$ E.S.	Media $\pm$ E.S.	Media $\pm$ E.S.	Media $\pm$ E.S.	Media $\pm$ E.S.	Media $\pm$ E.S.	Media $\pm$ E.S.	Media $\pm$ E.S.	Media $\pm$ E.S.	Media $\pm$ E.S.	Media $\pm$ E.S.	Media $\pm$ E.S.
<b>Cortisolo (pg/mg)</b>	8,49 $\pm$ 0,54	3,43 $\pm$ 0,61	2,35 $\pm$ 0,26	1,66 $\pm$ 0,23	1,89 $\pm$ 0,23	1,72 $\pm$ 0,17	1,83 $\pm$ 0,19	1,62 $\pm$ 0,14	1,42 $\pm$ 0,11	1,59 $\pm$ 0,13	2,03 $\pm$ 0,36	2,19 $\pm$ 0,40

**Tabella 15:** Concentrazioni di cortisolo rilevate nel pelo dei cani suddivisi in base all'età (media  $\pm$  E.S.).



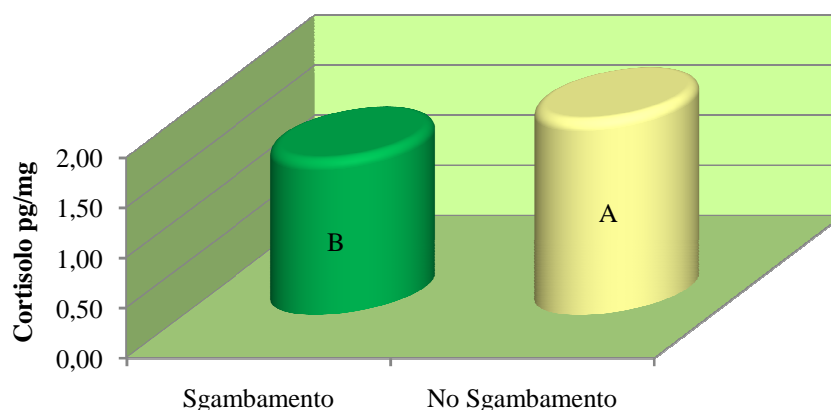
**Grafico 59:** Concentrazioni di cortisolo rilevate nel pelo dei cani utilizzati nella sperimentazione suddivise in base all'età (media  $\pm$  E.S.). Lettere diverse (A, B, C, D) indicano differenze significative ( $P < 0.05$ ).

Il confronto tra i cani di proprietà e quelli dei canili non ha messo in luce differenze significative tra le concentrazioni di cortisolo nel pelo (grafico 60).



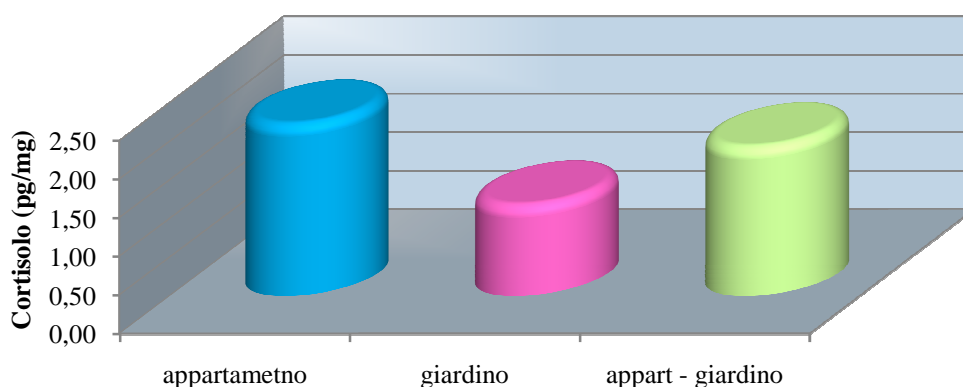
**Grafico 60:** Confronto tra le concentrazioni di cortisolo nel pelo dei cani dei canili e di proprietà (media  $\pm$  E.S.).

All'interno del gruppo dei cani di canile sono state evidenziate differenze significative ( $P < 0.05$ ) dei livelli di cortisolo nel pelo tra i cani che praticano lo “sgambamento” e quelli che non ne hanno la possibilità (grafico 61). Lo “sgambamento” soddisfacendo una delle esigenze naturali dei cani, indurrebbe un minor stato di stress e quindi una minor attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrenale.



**Grafico 61:** Concentrazioni di cortisolo nel pelo dei cani dei canili e in funzione, della pratica dello sgambamento (media  $\pm$  E.S.). Lettere diverse (A, B) indicano differenze significative ( $P < 0.05$ ).

All'interno del gruppo dei cani di proprietà, i cani che vivono esclusivamente in appartamento presentano livelli di cortisolo nel pelo superiori a quelli rilevati nei cani che vivono esclusivamente in giardino oppure in appartamento e giardino, anche se queste differenze non raggiungono la significatività statistica (grafico 62).



**Grafico 62:** Concentrazioni di cortisolo nel pelo dei cani di proprietà in funzione della tipologia abitativa (media  $\pm$  E.S.).

Quindi sembra che la possibilità di un “maggior movimento” induca una minore attività dell'asse HPA.

## ESPERIMENTO 2 – MODIFICAZIONI ENDOCRINE E DEL TEMPERAMENTO IN CANI DI CANILE SOTTOPOSTI A PERCORSO EDUCATIVO

### SCOPI

Questo esperimento prevedeva per alcuni cani di canile un programma di arricchimento articolato e protratto nel tempo per poter identificare quali elementi distintivi del rapporto cane-uomo (affetto, educazione e gioco) fossero più significativi per i cani.

### MATERIALI E METODI

#### AMBIENTE DI STUDIO

Lo studio, della durata di 5 mesi, è stato condotto presso un Canile Comunale che, sia per tipologia costruttiva sia per gestione, segue le linee guida stabilite dalla legge n. 281 del 14 agosto 1991.

Il canile è stato costruito nella seconda metà degli anni '90, su un'area recintata di 5.900 m<sup>2</sup>, lontana dai centri abitati, ed è dotato di 84 box, tutti con cucce termiche coibentate e pavimenti antisdrucciolo, e diverse aree di sgambamento. All'interno ci sono infermeria, degenza cani e gatti, lavaggio animali, cucina e magazzino, più un impianto di incenerimento per gli animali deceduti.

I cani per tutto il periodo dello studio sono stati ricoverati in box multipli composti da una parte coperta, parzialmente chiusa, e da un parchetto esterno. Il numero dei cani per ciascun box è stato deciso in funzione delle dimensioni dei boxes, della taglia e dell'indole dei cani. I boxes sono dotati di un numero di cucce pari al numero di animali presenti. Agli animali è stata data la possibilità di accedere liberamente, durante l'intera giornata, all'acqua di abbeverata contenuta in abbeveratoi posti all'interno del box in numero di uno ogni due cani. Infine ogni giorno veniva effettuata la pulizia del box e durante questa operazione i cani venivano spostati in zone recintate aperte.

#### SOGGETTI

Sono stati utilizzati 26 cani lungodegenti:

- CONTROLLI: 12 cani di cui 6 maschi e 6 femmine

- **ARRICCHITI:** 14 cani di cui 9 maschi e 5 femmine

I soggetti presi in considerazione nello studio sono cani di età compresa tra i 3 e i 10 anni circa, di tutte le taglie, meticci, residenti in canile da almeno 3 anni. Era importante ai fini dello studio che tutti i soggetti fossero docili per le diverse manipolazioni a cui dovevano essere sottoposti. I cani presi come controlli non dovevano essere in box con i cani arricchiti per evitare che la loro *routine* fosse modificata dalla presenza assidua degli educatori nei boxes dei cani che facevano addestramento.



**Figura 25:** Cani in canile.

## DISEGNO SPERIMENTALE

Tre educatrici a turno conducevano con ogni cane sessioni di arricchimento costituite da: educazione di base, gioco e svago e coccole. Le tre educatrici hanno lavorato a turno con ogni cane per evitare che si potesse instaurare un legame preferenziale ed un eccessivo attaccamento dei cani ad una singola persona. In questo modo il cane imparava a rispondere ai comandi di tre persone diverse aumentando le probabilità di risposta anche ai comandi impartiti da un eventuale futuro padrone. L'alternarsi di tre persone nelle sessioni di arricchimento, soprattutto nella fase di addestramento, avrebbe potuto rendere più difficoltoso al cane il percorso di apprendimento: per questo motivo le procedure di educazione sono state standardizzate e le tre educatrici si incontravano settimanalmente per verificare e discutere insieme i progressi di ogni cane.

La procedura si è articolata in 4 fasi:

Periodo di pre-arricchimento: per una settimana sono state raccolte le feci (tranne quelle corrispondenti al giorno in cui sono stati effettuati i test comportamentali) ed il pelo dei cani di entrambi i gruppi. Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad un test di

docilità/maneggiabilità. La procedura utilizzata è una versione modificata del test messo a punto da Mondelli *et al.* (2003) e da Valsecchi *et al.* (2001).

La procedura è strutturata in vari punti che ai fini dell'analisi statistica sono stati così suddivisi:

- *presenza di una persona non familiare*: il test inizia quando una persona non familiare entra nel box, ignora il cane e registra il comportamento del cane nei suoi confronti. Dopo circa un minuto, la persona sconosciuta prova ad interagire direttamente col cane, si avvicina, si abbassa, lo chiama ed annota la reazione del cane. Nel caso il cane voglia interagire, l'osservatore risponde al suo invito;
- *uscita dal box*: l'osservatore mette il guinzaglio al cane e lo conduce nello spazio erboso recintato osservandone la reazione al guinzaglio, all'uscita dal box ed ai cani presenti negli altri box;
- *manipolazione*: nella zona erbosa, sempre al guinzaglio, il cane viene accarezzato in varie parti del corpo, spazzolato, contenuto, sollevato e gli viene messa la museruola;
- *conoscenza dei comandi di base*: successivamente, durante una breve passeggiata al guinzaglio, l'osservatore valuta il livello di educazione del cane. Viene presa nota della reazione e relativa conoscenza da parte del cane del guinzaglio e relativi comandi quali “piede”, “seduto”, “terra”, “vieni” e “resta”;
- *gioco*: il cane viene liberato e coinvolto in una sessione di gioco con la palla e l'osservatore stesso;
- *reattività a comuni stimoli sonori e uditivi*: al cane sono presentati una comune pistola per bambini che produce diversi suoni (stimolo acustico) ed un ombrello che si apre a scatto (stimolo visivo). La sua reazione (curiosa, indifferente o spaventata) viene registrata;
- *presentazione della ciotola di cibo*: gli viene presentata una ciotola di cibo e l'osservatore testa la sua potenziale aggressività da dominanza, in questo caso la difesa del cibo;
- *ritorno*: il cane viene riportato al guinzaglio nel suo box e si annotano le reazioni all'entrata di fronte a conspecifici della stecca e ai compagni di box e nei riguardi della persona.

Nel test effettuato prima dell'arricchimento il ruolo di estranei è stato assunto da due educatrici non facenti parte del personale addetto alle pulizie; dopo il periodo di

arricchimento, quando sono stati ripetuti i test, il ruolo dell'estraneo è stato svolto da volontarie, tutte donne per evitare che variazioni nel comportamento dei cani fossero dovute al sesso e all'aspetto dell'estraneo.

Periodo di arricchimento: ai cani arricchiti sono state fatte sessioni di addestramento in un campo di agility alternate a sessioni di passeggiata. Durante queste 8 settimane sono state raccolte le feci di entrambi i gruppi di cani.

**Addestramento e svago:** l'addestramento ai comandi di base ("seduto", "terra", "resta", "vieni" e la condotta al guinzaglio) è stato condotto tramite metodi "gentili" (rinforzi positivi: carezze, lodi e bocconcini; punizioni negative: privazione dell'attenzione). I cani venivano prelevati dai rispettivi box ed, uno alla volta, portati con il guinzaglio al campo ove veniva offerta loro la possibilità di esplorare l'ambiente e successivamente cominciavano a lavorare cercando di indurli ad attuare i comportamenti desiderati tramite l'utilizzo di bocconcini. Al termine della fase di addestramento era data loro la possibilità di giocare con palline, con gli attrezzi di agility presenti nel campo e con le stesse educatrici. L'addestramento ed il gioco erano alternati a momenti in cui il cane veniva solo accarezzato e coccolato.

**Passeggiata:** oltre alle sessioni di addestramento i cani sono stati portati in passeggiata per un tratto di strada di circa 600 m (tratto che porta dal canile di nuova strutturazione a quello di vecchia strutturazione). Durante il percorso i soggetti venivano tenuti al guinzaglio e veniva impartito loro qualche comando di base appreso nel campo di agility. Le passeggiate avevano lo scopo di osservare meglio il cane in una realtà simile a quella che avrebbero incontrato una volta adottati e per abituare i cani alla vista di macchine, camion, motorini, biciclette, cani, gatti, altri animali e persone sconosciute. La strada che porta da un canile all'altro era frequentata dalle persone che andavano in visita al canile, dai muratori che stavano costruendo in quel periodo una nuova struttura e dagli operatori del canile stesso; questo ha permesso di lavorare in sicurezza facendo comunque entrare in contatto gli animali con realtà diverse.

Nelle prime 2 settimane di addestramento al campo di agility ogni cane lavorava 2 volte con la stessa persona per un totale di 6 giorni di addestramento della durata ciascuno di 15 minuti. Nelle successive 6 settimane si alternava il campo di agility alla passeggiata: ogni cane alla settimana faceva 2 passeggiate della durata di 15 minuti ciascuna e un giorno di addestramento al campo di agility della durata di 15 minuti. In totale ogni cane ha effettuato 6 sessioni di addestramento (avendo come addestratore per due volte la stessa persona) e 12 di passeggiata (avendo come conduttore per 4 volte la stessa



persona). In totale ogni cane arricchito ha svolto 12 sessioni di addestramento al campo e 12 sessioni di passeggiata.

Ogni cane aveva una scheda sulla quale venivano annotati i risultati di ogni sessione di addestramento e passeggiata arricchiti da eventuali note sul comportamento del cane.

Interruzione dell'arricchimento: le procedure adottate per l'arricchimento ambientale, venivano interrotte per sottoporre nuovamente i cani al test di docilità/maneggiabilità. E' stato tosato il pelo ricresciuto e per una settimana sono state raccolte le feci.

Post-arricchimento: dopo una settimana dall'interruzione dell'arricchimento è continuata la raccolta di feci per 15 giorni durante i quali i cani non venivano più in contatto con gli addestratori.

---

## METODI DI ANALISI

La determinazione della concentrazione di cortisolo, è stata effettuata mediante le tecniche radioimmunologiche (RIA) descritte precedentemente.

---

## ANALISI STATISTICA

Il test U di Mann Whitney è stato applicato per verificare l'omogeneità dei gruppi di cani arricchiti e dei controlli nei periodi pre e post arricchimento.

Al fine di valutare l'effetto dell'arricchimento ambientale di tipo sociale su entrambi i gruppi di cani è stato condotto il test di Wilcoxon confrontando i punteggi ottenuti nel test di docilità/maneggiabilità pre e post-arricchimento.

Un'analisi più precisa è stata effettuata tramite lo stesso test di Wilcoxon per riscontrare variazioni significative dei punteggi ottenuti durante le singole fasi del test (estraneo, uscita, manipolazione, comandi, gioco, reattività, ritorno e cibo) tra il periodo antecedente e quello successivo all'arricchimento sia per i cani di controllo sia per gli arricchiti.

Il contenuto di cortisolo nelle feci e nel pelo dei due gruppi di cani è stato analizzato nel periodo pre e post-arricchimento tramite analisi della varianza per misure ripetute.

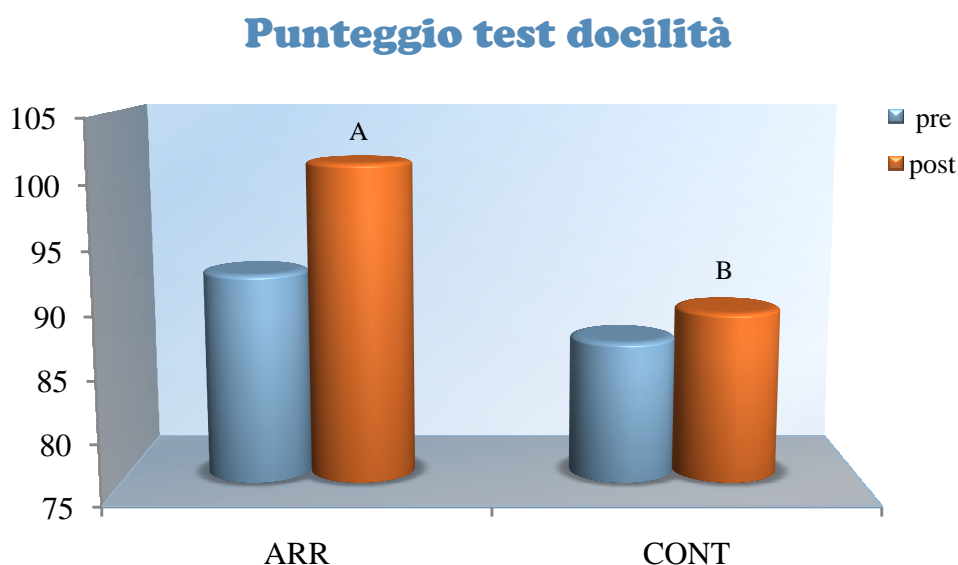
I dati sul comportamento nelle sessioni di addestramento e di passeggiata sono presentati in forma descrittiva per l'impossibilità, data l'enorme variabilità dei cani, di condurre test statistici.

## RISULTATI E DISCUSSIONI

### COMPORTEMENTO

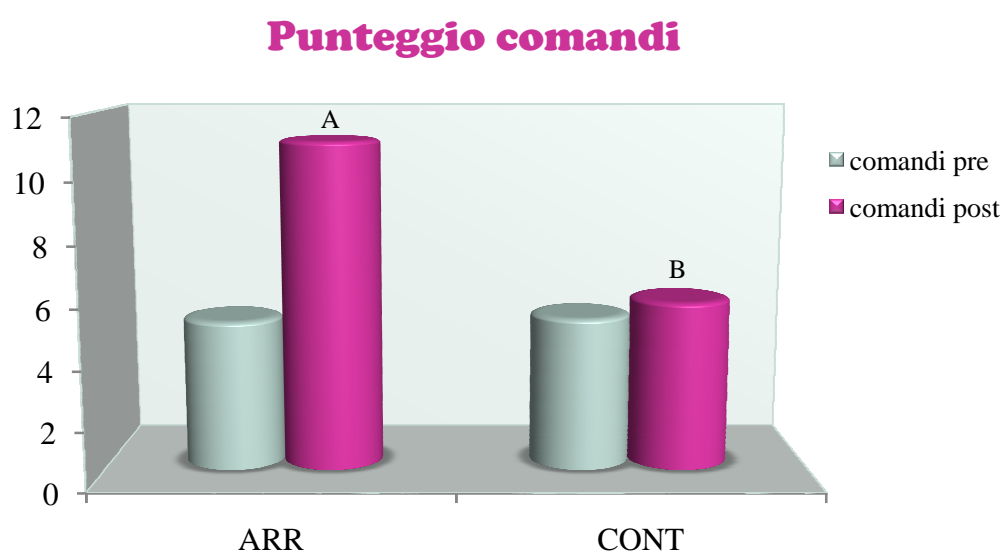
#### TEST DI DOCILITÀ

Ciò che è emerso dal test U di Mann Whitney è l'esistenza di una differenza significativa tra i cani del gruppo arricchiti (ARR) e quelli di controllo (CONT) successiva, ma non antecedente, all'arricchimento ( $P=0,003$ ;  $P=n.s.$ , grafico 63). Ciò dimostra che se inizialmente il campione era omogeneo, in conseguenza all'educazione e alle passeggiate a cui sono stati sottoposti i cani arricchiti, i risultati del test finale hanno evidenziato per quest'ultimi punteggi maggiori rispetto ai controlli. Il test di Wilcoxon ha rilevato che i soggetti sottoposti ad arricchimento ambientale hanno avuto un miglioramento significativo in conseguenza all'arricchimento: una differenza significativa è emersa tra il pre e post-arricchimento ( $n=13$ ,  $P=0.0023$ ); lo stesso non si è verificato per i cani del gruppo controllo i quali non hanno subito modificazioni significative tra il test effettuato nel periodo antecedente e quello successivo all'arricchimento ( $n=11$ ,  $P=n.s.$ ; grafico 63).



**Grafico 63:** Punteggio medio ottenuto dai cani dei due gruppi nel test di docilità/maneggiabilità prima e dopo il periodo di arricchimento. Lettere diverse (A, B) indicano differenze significative ( $P<0.05$ ).

La maggiore docilità riscontrata nei cani arricchiti è data dall'acquisizione di abilità nell'eseguire comandi: infatti, il fattore che influisce significativamente nel differenziare i punteggi dei cani arricchiti nei due periodi è quello dei comandi ( $n=13$ ,  $P=0,0033$ , grafico 64). Occorre sottolineare come, anche se in modo indiretto e senza influenzare in modo sostanziale le capacità dei cani, anche i controlli abbiano avuto un aumento generale della docilità; in particolare, inizialmente i soggetti appartenenti ai controlli erano un gruppo disomogeneo (alcuni avevano ottenuto punteggi alti ed altri di molto inferiori ai cani arricchiti) e successivamente all'arricchimento i cani con punteggi minori si siano uniformati agli altri.



**Grafico 64:** Punteggio medio ottenuto dai cani nei comandi dei due gruppi nel test di docilità/maneggiabilità prima e dopo il periodo di arricchimento. Lettere diverse (A, B) indicano differenze significative ( $P<0.05$ ).

Il fatto che entrambi i gruppi di cani siano risultati complessivamente docili per quanto riguarda la manipolazione, la reazione all'uscita ed al rientro è dovuto ad una necessità iniziale data dalla collaboratività che i soggetti dovevano presentare al fine di sottoporli ai vari test (sia controlli che arricchiti). Inoltre i cani del gruppo arricchiti sono stati scelti al fine di aumentare la loro probabilità di essere adottati quindi in partenza sono stati scelti quei soggetti di aspetto gradevole e con temperamento piuttosto mite.

#### *ADDESTRAMENTO AL CAMPO DI AGILITY*

I cani di canile a differenza di quelli di proprietà, non ricevendo grandi attenzioni nell'arco della giornata da parte delle persone, durante le fasi di addestramento si

mostravano molto attenti nei confronti degli addestratori e poco interessati all'ambiente che li circondava. Probabilmente, nonostante il campo di agility fosse per loro sconosciuto, rappresentava comunque un luogo recintato simile allo sgambamento dove ogni giorno vengono liberati mentre gli operatori puliscono i box.

Un'altra peculiarità è stata il loro scarso interesse verso il cibo come premio durante gli esercizi; questo è dovuto al fatto che il cane di canile ha la certezza del pasto caldo, mentre si mostra più motivato al contatto fisico con le persone, che invece nella routine quotidiana è raro.

Purtroppo si è notata anche una scarsa propensione al gioco data dall'età avanzata dei soggetti ma anche da una disabitudine al gioco. Molti cani, infatti, non conoscevano la pallina, alcuni rimanevano indifferenti, altri ne erano terrorizzati.

I pochi interessati sono apparsi molto motivati e riportavano sempre l'oggetto in questione, dimostrandosi molto collaborativi, non mostrando possessività o distruttività verso di esso.

Capacità di apprendere: molti dei cani arricchiti erano in grado prima delle sessioni di addestramento di eseguire determinati comandi; molti conoscevano il comando “seduto”. Anche il guinzaglio era conosciuto ai più; molti ne conoscevano però un uso scorretto. I cani che avevano appreso a tirare al guinzaglio sono stati i più difficili da correggere mentre quei cani che ne ignoravano la funzione hanno imparato molto in fretta a stare al piede.

Molti dei soggetti considerati nello studio hanno mostrato buone capacità di apprendimento; infatti dopo il periodo di arricchimento erano in grado di eseguire il “seduto”, il “terra”, il “vieni” (comando più facile da imparare per dei cani che ciò che più desiderano è una persona che li voglia accanto) e il “piede”. Molto più rari sono stati coloro che hanno imparato il “resta”.

Ci sono stati poi soggetti quasi completamente disinteressati agli esercizi, inoltre qualcuno non ha mostrato segni di interesse verso cibo, coccole etc.

## *PASSEGGIATA*

---

Mentre un cane di proprietà è abituato allo spazio aperto e alla passeggiata col padrone, il cane di canile di fronte allo spazio aperto non recintato si è mostrato molto eccitato nella prima uscita. Durante le prime passeggiate i soggetti si interessavano all'ambiente, eseguendo di rado i comandi appresi al campo di agility, tirando al

guinzaglio in modo insistente, marcando il territorio, la maggior parte affatto intimoriti da macchine, persone ed altri animali. Col susseguirsi delle uscite i cani hanno prestato maggiore attenzione agli educatori e anche l'eccitazione è diminuita.

Durante le fasi di preparazione alla passeggiata, ossia il momento in cui gli educatori entravano nei box, facevano indossare il guinzaglio ai cani e li portavano fuori, la maggior parte dei soggetti non ha avuto dimostrazioni di paura. Un cane ha vinto la sua fobia iniziale per il guinzaglio, 2 hanno mostrato di avere timore verso un cane compagno di box e uno di questi in particolare si rinchiudeva nella cuccia al momento dell'uscita a causa di un suo conspecifico. Il cane, in questione per tutto il periodo dell'arricchimento ha avuto problemi nell'apprendere i comandi di base, risultando inibito in ogni situazione a causa di problemi relazionali verso stimoli ambientali e sociali. In seguito allo spostamento di box del cane oppressore, si sono avuti miglioramenti sostanziali nel comportamento del soggetto timoroso.

In passeggiata i cani erano sottoposti a stimoli di varia natura: veicoli che transitavano lungo la strada, persone sconosciute e non, conspecifici e altri animali.

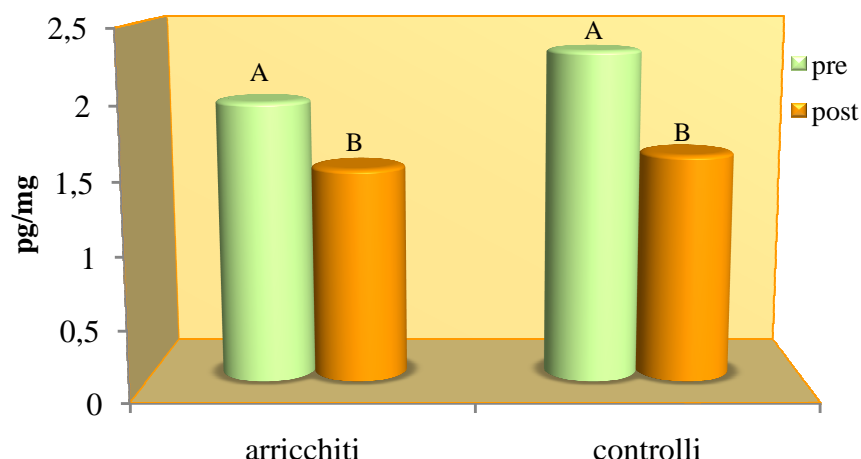
Su 168 uscite totali effettuate con 14 cani arricchiti, si sono riscontrati pochi episodi "sgradevoli": nonostante i cani di canile non abbiano opportunità di entrare a contatto con macchine, motorini, camion e betoniere sono pochi i cani che si sono spaventati dal loro passaggio probabilmente perché abituati al rumore che questi producono. Si sono riscontrati alcuni casi in cui qualche soggetto si è mostrato interessato al passaggio di una lepre, di stormi di uccelli o di una capra rilevando quindi aggressività predatoria. Ci sono state anche occasioni di aggressività tra cani: mai tra il cane arricchito e uno sconosciuto (di qualche visitatore del canile o dei cani liberi nel canile della struttura vecchia) ma tra cani della stessa stecca (per inimicizie o possessività nei confronti delle educatrici). Questo dimostra come l'aggressività tra cani presenti nei canili è fomentata dalla presenza delle sbarre dei box che si interpongono tra i soggetti.

---

## DATI ORMONALI

L'analisi della varianza per misure ripetute mostra una diminuzione significativa del cortisolo contenuto nel pelo al termine dell'arricchimento (post) rispetto a quello contenuto nel pelo prima di iniziare l'arricchimento (pre), e questo è valido per tutti i cani indipendentemente dal gruppo di appartenenza ( $P=0,0002$ ; grafico 65). Non esistono differenze in base al sesso dei cani.

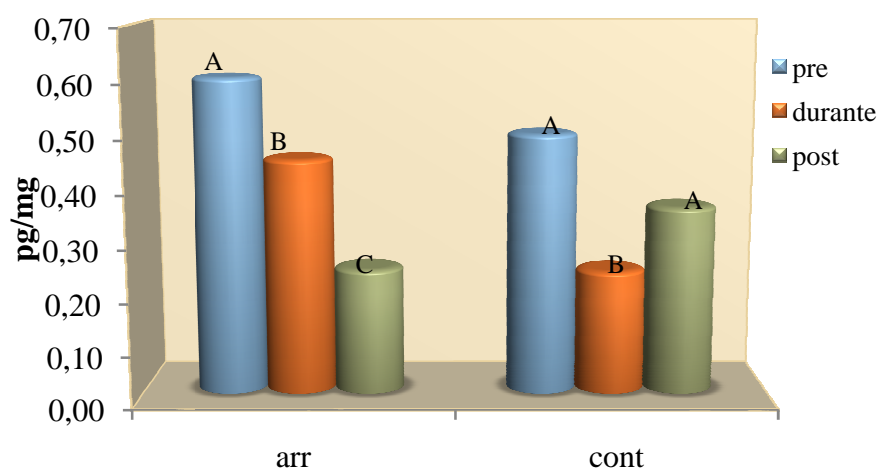
### Cortisolo pilifero



**Grafico 65:** Concentrazione del cortisolo pilifero (pg/mg) nei cani arricchiti e nei controlli nella fase precedente e in quella successiva l'arricchimento ambientale. Lettere diverse (A, B) indicano differenze significative ( $P < 0.05$ ).

Come si può vedere dalla figura 66, anche il cortisolo fecale mostra una diminuzione significativa nel tempo in entrambi i gruppi di cani ( $P < 0,01$ ). La diminuzione del cortisolo nelle feci è però più marcata e costante per i cani arricchiti, nei quali il calo di cortisolo è significativo anche nel periodo in cui il programma di arricchimento era ormai terminato. Nei cani di controllo, invece, si assiste ad un calo del cortisolo fecale mentre il programma è in atto, ma poi l'ormone torna a salire.

### Cortisolo fecale



**Grafico 66:** Concentrazione del cortisolo fecale (pg/mg) nei cani arricchiti e nei controlli nella fase precedente l'arricchimento ambientale, durante il programma di arricchimento e nel periodo successivo al programma. Lettere diverse (A, B, C, D) indicano differenze significative ( $P < 0.05$ ).

Quindi l'arricchimento ha esercitato un'influenza positiva portando ad una riduzione dei livelli di cortisolo nei campioni di pelo sia nei soggetti arricchiti che in quelli non sottoposti al trattamento .

## ESPERIMENTO 3 - EFFETTI DELL'ARRICCHIMENTO AMBIENTALE NEI CANI ANZIANI DI CANILE

### SCOPI

La maggiore attenzione verso i *pets* ha portato, tra le numerose conseguenze, ad un allungamento della loro vita: secondo l'*American Hospital Association* l'aspettativa di vita media dei cani è salita dai 7-8 anni degli anni Settanta ai 10-15 anni di oggi.

Data la preferenza del pubblico per l'adozione di soggetti giovani, è ragionevole supporre, malgrado manchino dati precisi a riguardo, che molti dei cani che trascorrono lunghi periodi in canile, siano soggetti di età avanzata.

La vecchiaia porta inevitabilmente con sé un deterioramento più o meno grave delle condizioni sia fisiche che mentali e, di conseguenza, una serie di turbe comportamentali età-correlate. Considerato che "la mente del cane è resa più funzionale attraverso le informazioni che riceve" (Fogle, 2000), indipendentemente dalla presenza di patologie organiche e comportamentali, risulta opportuna l'attuazione di modificazioni ambientali, in termini di ambiente sia fisico che sociale, per migliorare la qualità della vita del cane anziano.

Considerate queste premesse, il presente studio mira all'identificazione ed alla valutazione degli effetti - sulla base di osservazioni comportamentali e parametri fisiologici - di semplici forme di arricchimento ambientale (musica, giochi, interazione con l'uomo) in un gruppo di cani anziani.

### MATERIALI E METODI

#### AMBIENTE DI STUDIO

Lo studio si è svolto presso un canile intercomunale che ospita all'incirca 55 cani. Il canile è costituito da 22 box, 4 locali per la quarantena ed 1 infermeria. Inoltre sono presenti anche un ambulatorio veterinario, un ufficio, un bagno, uno spogliatoio per il personale, una cucina ed, infine, un magazzino dotato di un congelatore.

I box presentano una parte coperta ed una scoperta, entrambe con pavimentazione in cemento, ad eccezione di 4 box dotati della sola area coperta, di dimensioni minori rispetto ai precedenti.



La parte coperta include un reparto notte chiuso, sopraelevato da terra, con pavimentazione in plastica. La parte scoperta confina con un'area di sgambamento, comune a due box, di cui i cani usufruiscono in momenti diversi della giornata. Ciascun box ospita da 1 a 4 cani a seconda delle dimensioni del box stesso, della taglia e dell'indole dei cani. In ogni box è presente un numero di ciotole pari al numero dei cani ospitati, più recipienti per l'acqua d'abbeverata e cuccie di plastica sopraelevate dal pavimento. La pulizia dei box viene effettuata quotidianamente dal personale dipendente del canile prima del pasto; quest'ultimo viene somministrato una volta al giorno

---

## SOGGETTI DELLO STUDIO

Il campione è costituito da 9 cani (3 femmine sterilizzate e 6 maschi interi), di tutte le taglie, sia meticci che di razza, di età compresa tra i 7 ed i 15 anni. Sono stati considerati anziani i soggetti di età superiore ai 7 anni se di taglia grande ed i soggetti di età superiore ai 10 anni se di taglia piccola (Normando *et al.*, 2006).

Sono stati esclusi dallo studio i soggetti affetti da gravi patologie che potessero influenzare il comportamento o le concentrazioni ormonali in esame, nonché i soggetti ritenuti aggressivi dal personale del canile.



**Figura 26:** Soggetto dello studio

---

## ARRICCHIMENTO AMBIENTALE

Le forme di arricchimento somministrate ai cani sono state 4:

1) musica (musica): per 5 ore al giorno i cani del “gruppo arricchimento” hanno avuto la possibilità di sentire musica emessa da una radio collocata in prossimità dei loro box;

2) giochi (giochi): per tutto il giorno e tutta la notte i cani hanno avuto la possibilità di giocare con una pallina ed un pupazzetto di gomma appesi alla recinzione dei box;

3) interazione con una persona giovane (giovane): per 15 minuti in 3 giorni settimanali (lunedì, mercoledì e venerdì), per un totale di 45 minuti per ciascun soggetto, i cani hanno avuto la possibilità di interagire con una persona di età compresa tra i 20 ed i 30 anni;

4) interazione con una persona anziana (anziano): per 15 minuti in 3 giorni settimanali (lunedì, mercoledì e venerdì), per un totale di 45 minuti per ciascun soggetto, i cani hanno avuto la possibilità di interagire con una persona di età superiore ai 65 anni. Durante l’interazione i cani sono stati accarezzati, spazzolati ed invitati al gioco.

Ciascuna forma di arricchimento è stata somministrata per un periodo di 6 giorni (**periodo di arricchimento**).

Tutti i periodi di arricchimento sono stati preceduti da un **periodo di pre-aricchimento**, in cui non è stata fornita nessuna forma di arricchimento, e seguiti da un **periodo di post-aricchimento**, in cui è stata tolta la forma di arricchimento precedentemente fornita. Entrambi i periodi hanno avuto una durata di 6 giorni.

Lo schema dell’intero programma di arricchimento è riportato in tabella 16.

Pre-musica	Musica	Post-musica	Pre-giochi	Giochi	Post-giochi	Pre-giovane	Giovane	Post-giovane	Pre-anziano	Anziano	Post-anziano
gg 1-6	gg 7-12	gg 13-18	gg 19-24	gg 25-29	gg 30-35	gg 36-41	gg 42-47	gg 48-53	gg 54-59	gg 60-65	gg 66-71

**Tabella 16:** Schema dell’intero programma di arricchimento.

## OSSERVAZIONI COMPORTAMENTALI

Per l’intero periodo della sperimentazione sono state effettuate osservazioni comportamentali che per rispettare le esigenze operative del personale, sono avvenute 2 volte a settimana (lunedì e venerdì) per 3 ore al giorno, durante la mattinata. Tali osservazioni sono state effettuate mediante la metodica *instantaneous scan sampling* ogni 3 minuti durante i periodi di pre-aricchimento, arricchimento e post-aricchimento. Per

ogni cane sono state registrate: l'attività svolta, la posizione e la localizzazione all'interno del box.

Le attività considerate dall'osservatore, raggruppate in 7 categorie comportamentali, sono indicate nella tabella 17. Qualsiasi attività svolta dal cane non appartenente a nessuna categoria comportamentale sotto indicata è stata registrata come categoria "ALTRO".

Le tabelle 18 e 19 riportano la posizione e la localizzazione dei singoli cani all'interno del box.

<b>Categorie comportamentali</b>	<b>Attività registrate</b>
<b>INATTIVITA'</b>	Seduto
	Sdraiato
	Dormire
	Fermo
<b>ATTIVITA'</b>	Camminare
	Alzarsi
	Sedersi
	Sdraiarsi
	Mangiare/bere
	Urinare/defecare
	Gioco da solo
	Gioco con cani
<b>VOCALIZZAZIONI</b>	Abbaire
	Ringhiare
	Mugolare
<b>ATTIVITA' SOSTITUTIVE</b>	Sbadigliare
	Ansimare
	Leccarsi il naso
<b>ATTEGGIAMENTI DI FUGA</b>	Arrampicarsi sulla porta
	Saltare sul muro
	Scavare
	Stare alla porta
<b>ATTEGGIAMENTI ESPORATIVI</b>	Sniffare
	Leccare oggetti
	Annusare/toccare oggetti

<b>RICERCA DI ATTENZIONE/ECCITABILITA'</b>	Polidipsia
	Tremolii
	Ricerca del contatto
<b>ALTRO</b>	Altre attività non rientranti nelle precedenti categorie

**Tabella 17:** Attività svolte dal cane registrate dall'osservatore.

Decubito sterno-costale con testa alzata
Decubito sterno-costale con testa abbassata
Decubito laterale con testa flessa
Decubito laterale con testa alzata
Decubito laterale con testa abbassata

**Tabella 18:** Posizioni del cane registrate dall'osservatore.

Dentro la cuccia
Fuori dalla cuccia
Sopra la cuccia
Vicino alla porta del box
Lontano dalla porta del box

**Tabella 19:** Localizzazioni del cane all'interno del box registrate dall'osservatore.

## PARAMETRI FISIOLÓGICI

Durante il periodo sperimentale, compreso tra settembre e dicembre, per lo studio dell'effetto delle diverse forme di arricchimento ambientale sui parametri endocrini dei cani in esame, sono stati effettuati campionamenti di pelo e feci.

Le feci sono state raccolte 3 volte a settimana (lunedì, mercoledì e venerdì), poste in buste di plastica, identificate (nome e numero del soggetto, data del prelievo) e conservate ad una temperatura pari a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento delle analisi.

La raccolta del pelo è stata effettuata rasando completamente, per 3 volte durante l'intero periodo delle osservazioni, con l'ausilio di una tosatrice, la regione del garrese; successivamente il pelo è stato posto in buste di plastica, identificato (nome e numero del soggetto, data del prelievo) e conservato a temperatura ambiente in attesa di essere analizzato.

Sui campioni di pelo e feci sono state valutate le concentrazioni di cortisolo.

## METODI DI ANALISI

La determinazione della concentrazione di cortisolo è stata effettuata mediante le tecniche radioimmunologiche (RIA) precedentemente descritte.

## ANALISI STATISTICA

Per l'elaborazione statistica dei dati raccolti, sia comportamentali che fisiologici, sono stati impiegati test ANOVA (Test di Friedman) e Test di U Mann-Withney (Test di Wilcoxon-Somma dei Ranghi) con correzione di Bonferroni.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### COMPORTAMENTO

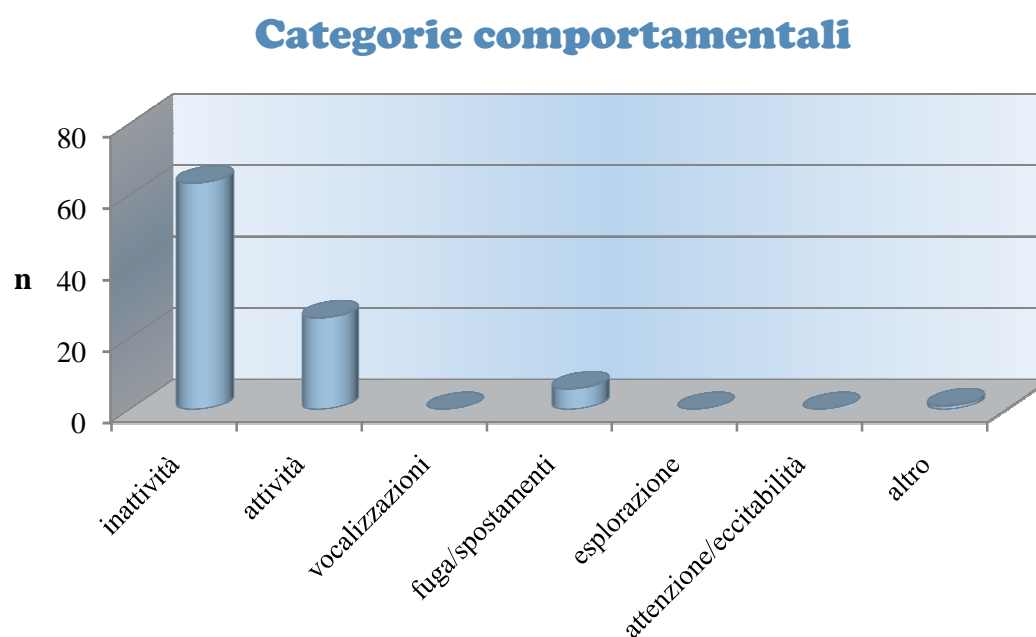
L'analisi statistica è stata eseguita su tutte le categorie comportamentali ad eccezione di quella denominata “Attività sostitutive” in quanto i comportamenti appartenenti a questa categoria (sbadigliare, ansimare e leccarsi il naso) si sono manifestati con una frequenza estremamente bassa (1,87 %).

Le categorie comportamentali significativamente influenzate dalle diverse forme di arricchimento fornite durante l'intero periodo sperimentale sono: ATTIVITA', INATTIVITA', ATTEGGIAMENTI DI FUGA/SPOSTAMENTI ed ALTRO (tabella 20).

Categoria comportamentale	Chi quadro (n=9, gl=11)	p	Coefficiente di concordanza di Kendall	Rango medio (R)
<b>ATTIVITA'</b>	28,4	0,0020	0,28	0,19
<b>INATTIVITA'</b>	33,1	0,0004	0,33	0,25
<b>ATTEGGIAMENTI DI FUGA</b>	33,05	0,0005	0,33	0,25
<b>ALTRO</b>	20,49	0,0300	0,20	0,10

**Tabella 20:** Categorie comportamentali significativamente influenzate dalle diverse forme di arricchimento.

Le rimanenti categorie comportamentali (VOCALIZZAZIONI, ATTEGGIAMENTI ESPLORATIVI e RICERCA DI ATTENZIONE/ECCITABILITA') non hanno, invece, subito modificazioni significative (grafico 67).



**Grafico 67:** Modificazioni delle diverse categorie comportamentali in seguito all'arricchimento (mediana).

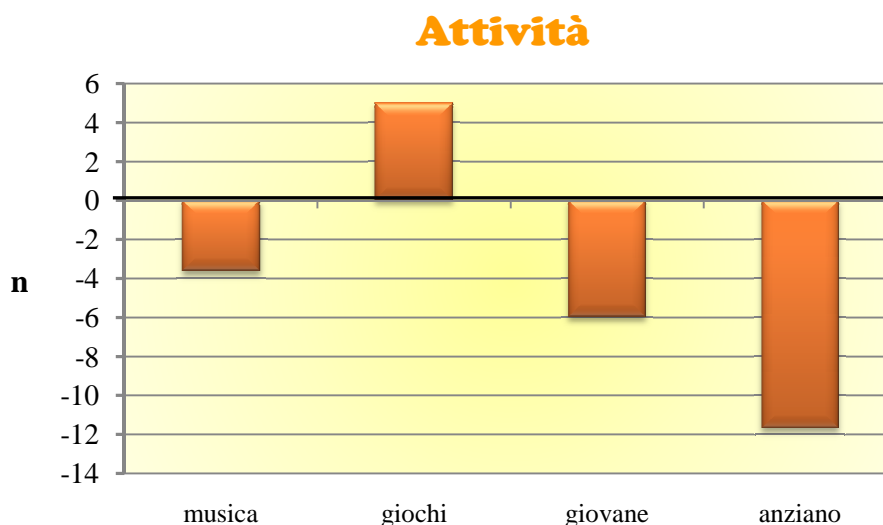
Per ciascuna delle 4 categorie comportamentali risultate significativamente modificate (ATTIVITA', INATTIVITA', ATTEGGIAMENTI DI FUGA/SPOSTAMENTI ed ALTRO), si è proceduto al confronto delle 4 forme di arricchimento (musica, giochi, interazione con una persona giovane, interazione con una persona anziana) considerando per ognuna i 3 periodi (pre-arricchimento, arricchimento e post-arricchimento), ma nulla è risultato significativo.

Dal confronto delle 4 forme di arricchimento fornite, considerando, per ognuna, solo i primi 2 periodi (pre-arricchimento ed arricchimento), sono risultate significativamente modificate le stesse 4 categorie comportamentali ATTIVITA', INATTIVITA', ATTEGGIAMENTI DI FUGA/SPOSTAMENTI ed ALTRO (Tabella 20).

Categoria comportamentale	Chi quadro (n=9, gl=3)	P	Coefficiente di concordanza di Kendall	Rango medio (R)
<b>ATTIVITA'</b>	8,06	0,040	0,29	0,21
<b>INATTIVITA'</b>	11,4	0,009	0,42	0,35
<b>ATTEGGIAMENTI DI FUGA</b>	9,67	0,020	0,35	0,27
<b>ALTRO</b>	8,79	0,030	0,32	0,24

**Tabella 20:** Categorie comportamentali significativamente influenzate dai periodi pre-arricchimento ed arricchimento di ciascuna forma di arricchimento.

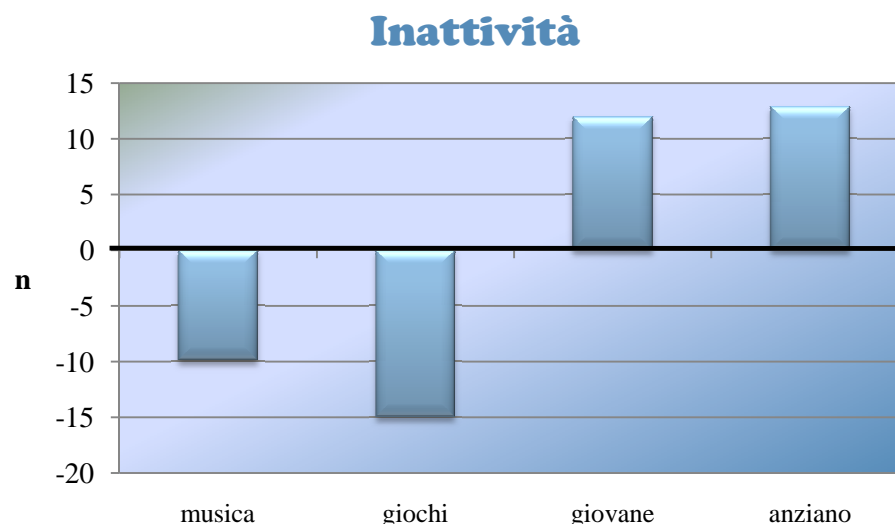
I grafici 68, 69, 70 e 71 mostrano le modificazioni verificatesi a carico di ciascuna delle categorie comportamentali risultate significativamente influenzate.



**Grafico 68:** Modificazioni della categoria comportamentale ATTIVITA' durante i periodi pre-arricchiamento ed arricchimento (mediana).

Il grafico 68 evidenzia un incremento dei moduli comportamentali compresi nella categoria ATTIVITA' (camminare, alzarsi, sedersi, sdraiarsi, mangiare/bere, urinare/defecare, gioco da solo, gioco con cani) in presenza dei giochi, mentre, la musica, l'interazione con una persona giovane e l'interazione con una persona anziana ne determinano una riduzione. In particolare, la forma di arricchimento responsabile delle maggiori modificazioni verificatesi a carico della categoria comportamentale ATTIVITA' è rappresentata dall'interazione con una persona anziana, che ha determinato una notevole riduzione dell'attività dei cani osservati.

Dall'ulteriore analisi statistica, effettuata confrontando i periodi di pre-arricchiamento ed arricchimento di ciascuna forma di arricchimento fornita, si sono ottenuti risultati significativi soltanto per la forma di arricchimento giochi.

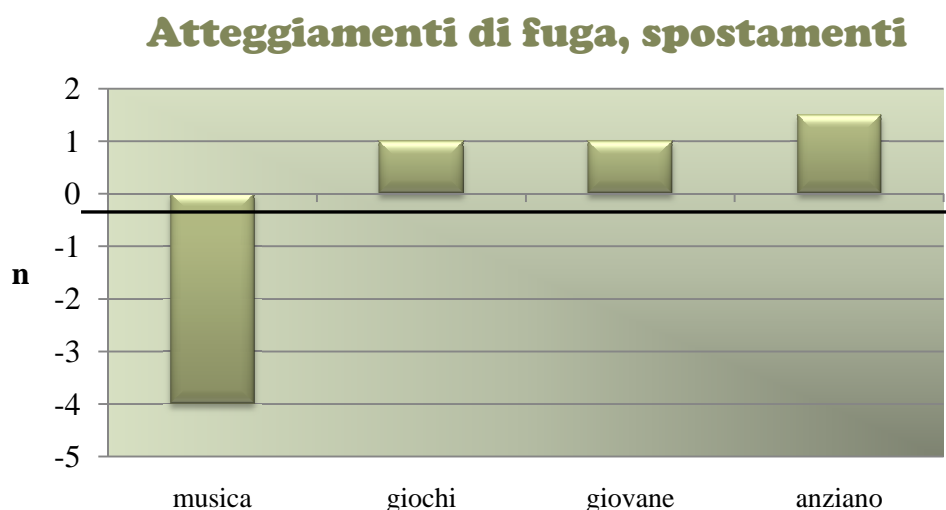


**Grafico 69:** Modificazioni della categoria comportamentale INATTIVITA' dal periodo di pre-arricchimento a quello di arricchimento

Il grafico 69 mostra come la categoria comportamentale INATTIVITA' abbia subito le maggiori modificazioni nel periodo corrispondente all'introduzione dei giochi che hanno determinato un'evidente riduzione dei moduli comportamentali compresi in questa categoria (seduto, sdraiato, dormire, fermo), analogamente alla forma di arricchimento musica che ha, però, inciso in misura minore. Opposto risulta, invece, l'effetto delle forme di arricchimento interazione con una persona giovane ed interazione con una persona anziana: entrambe hanno, infatti, comportato un aumento dell'INATTIVITA'.

Dall'ulteriore analisi statistica effettuata confrontando i periodi di pre-arricchimento ed arricchimento di ciascuna forma di arricchimento fornita, si sono ottenuti risultati significativi per le forme di arricchimento giochi e musica.

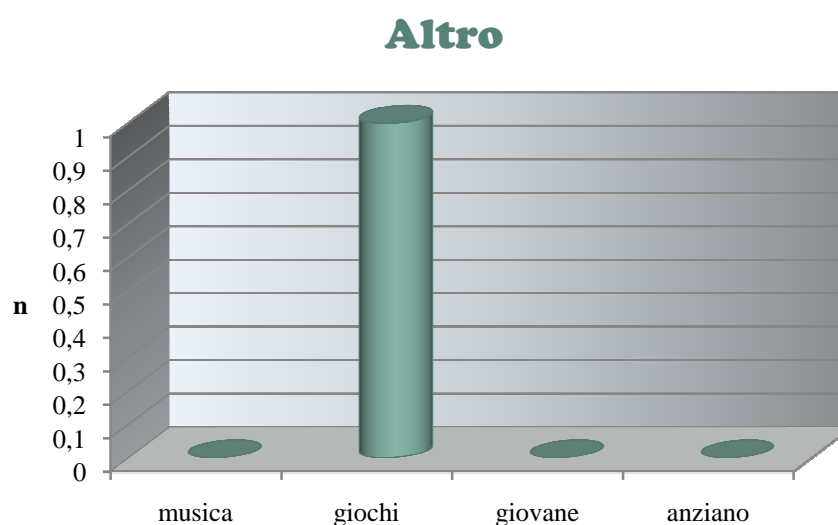




**Grafico 70:** Modificazioni della categoria comportamentale ATTEGGIAMENTI DI FUGA/SPOSTAMENTI durante i periodi pre-arricchiamento ed arricchimento (mediana).

A carico della categoria comportamentale ATTEGGIAMENTI DI FUGA/SPOSTAMENTI, la musica ha determinato un'evidente riduzione dei moduli comportamentali compresi nella categoria (arrampicarsi sulla porta, saltare sul muro, scavare e stare alla porta), mentre i giochi, l'interazione con una persona giovane e l'interazione con una persona anziana ne hanno determinato l'incremento (grafico 70).

Dall'ulteriore analisi statistica, effettuata confrontando i periodi di pre-arricchiamento ed arricchimento di ciascuna forma di arricchimento fornita, si sono ottenuti risultati significativi soltanto per la forma di arricchimento musica.



**Grafico 71:** Modificazioni della categoria comportamentale ALTRO durante i periodi pre-arricchiamento ed arricchimento (mediana).

A carico della categoria comportamentale ALTRO, si osservano modificazioni nel periodo corrispondente all'introduzione della forma di arricchimento giochi (grafico 71). L'ulteriore analisi statistica, effettuata confrontando i periodi di pre-arricchimento ed arricchimento di ciascuna delle forme di arricchimento fornite, non ha evidenziato risultati significativi.

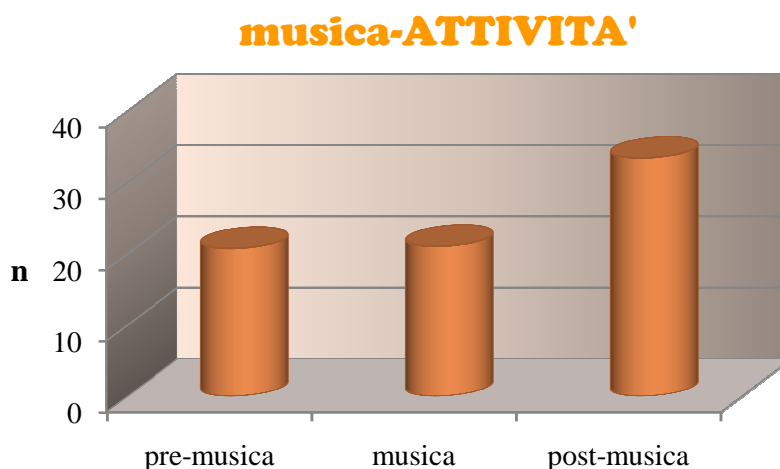
Procedendo, per ciascuna forma di arricchimento, al confronto tra i tre periodi pre-arricchimento, arricchimento e post-arricchimento, sono risultate significative la musica, i giochi e l'interazione con una persona anziana.

Più precisamente, la forma di arricchimento musica è risultata significativa per le categorie comportamentali ATTIVITA', INATTIVITA' ed ATTEGGIAMENTI DI FUGA/SPOSTAMENTI (tabella 21).

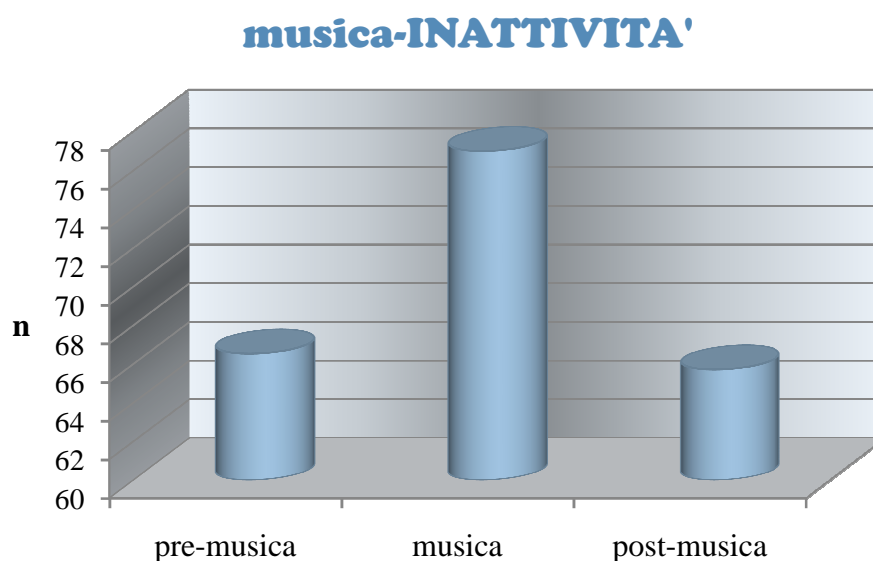
Categoria comportamentale	Chi quadro (n=9, gl=3)	P	Coefficiente di concordanza di Kendall	Rango medio (R)
<b>ATTIVITA'</b>	11,55	0,003	0,64	0,59
<b>INATTIVITA'</b>	8,00	0,018	0,44	0,37
<b>ATTEGGIAMENTI DI FUGA</b>	8,19	0,016	0,45	0,38

**Tabella 21:** Significatività della forma di arricchimento MUSICA per le diverse categorie comportamentali (mediana).

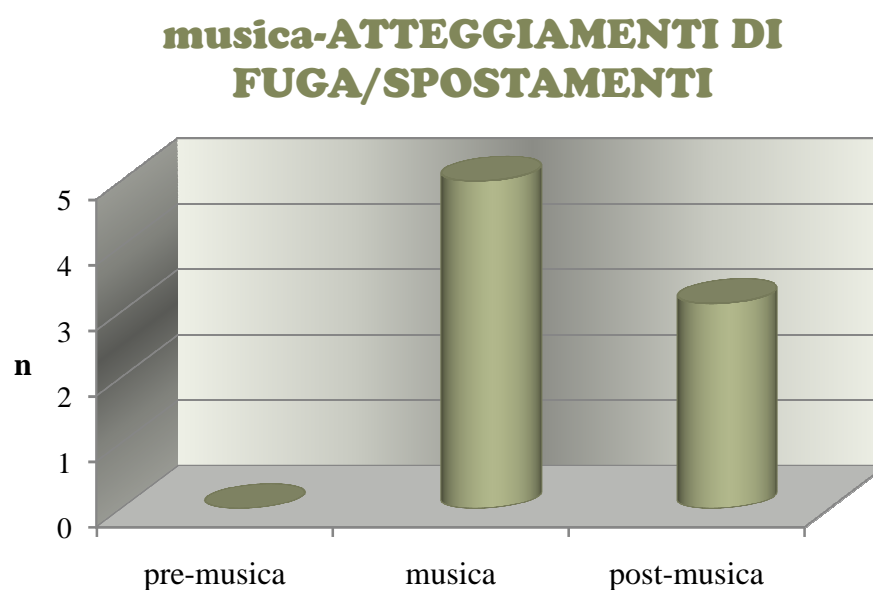
I grafici 72, 73 e 74 mostrano l'influenza dei 3 periodi pre-arricchimento, arricchimento e post-arricchimento della forma di arricchimento musica rispettivamente per le categorie comportamentali ATTIVITA', INATTIVITA' ed ATTEGGIAMENTI DI FUGA/SPOSTAMENTI.



**Grafico 72:** Influenza dei 3 periodi pre-arricchimento, arricchimento e post-arricchimento della forma di arricchimento musica per la categoria comportamentale ATTIVITA' (mediana).



**Grafico 73:** Influenza dei 3 periodi pre-arricchimento, arricchimento e post-arricchimento della forma di arricchimento musica per la categoria comportamentale INATTIVITA' (mediana).



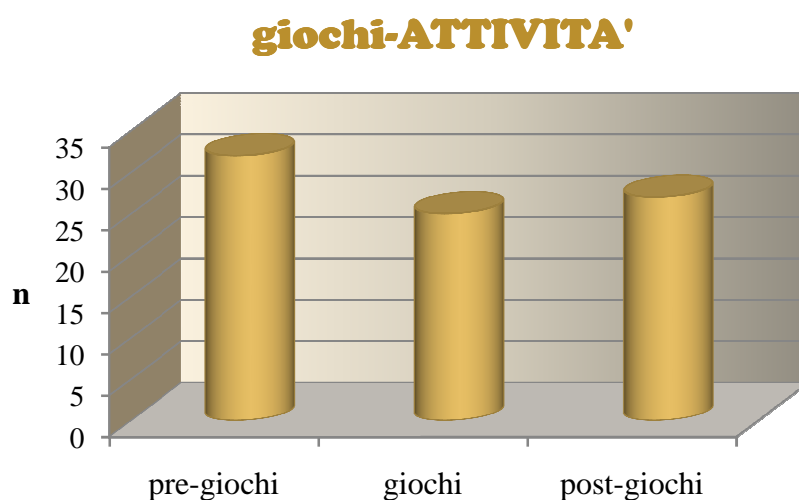
**Grafico 74:** Influenza dei 3 periodi pre-arricchimento, arricchimento e post-arricchimento della forma di arricchimento musica sulla categoria comportamentale ATTEGGIAMENTI DI FUGA/SPOSTAMENTI (mediana).

La forma di arricchimento giochi è risultata significativa per le categorie comportamentali ATTIVITA', INATTIVITA' ed ALTRO (tabella 22).

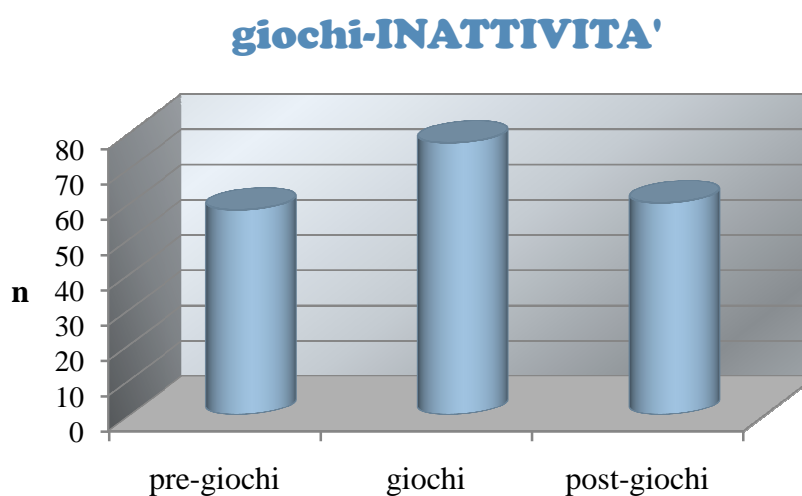
Categoria comportamentale	Chi quadro (n=9, gl=3)	p	Coefficiente di concordanza di Kendall	Rango medio (R)
<b>ATTIVITA'</b>	6,22	0,044	0,34	0,26
<b>INATTIVITA'</b>	8,22	0,016	0,45	0,38
<b>ALTRO</b>	7,58	0,022	0,42	0,34

**Tabella 22:** Significatività della forma di arricchimento GIOCHI per le diverse categorie comportamentali.

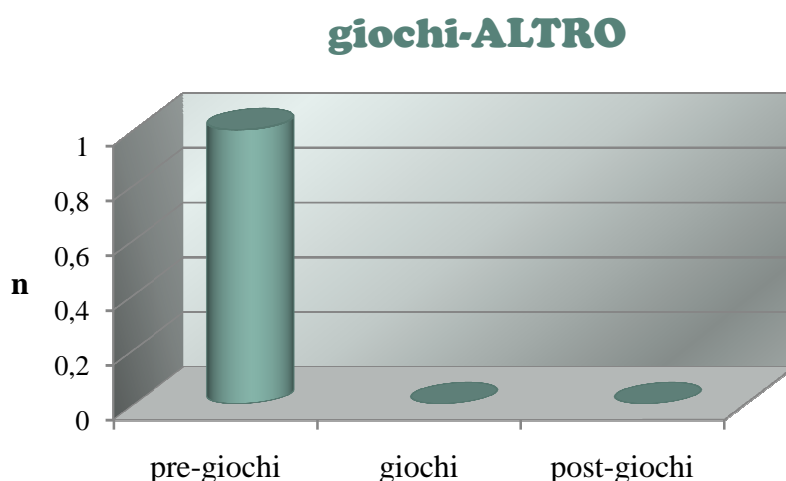
I grafici 75, 76 e 77 mostrano l'influenza dei 3 periodi pre-arricchimento, arricchimento e post-arricchimento della forma di arricchimento giochi rispettivamente sulle categorie comportamentali ATTIVITA', INATTIVITA' ed ALTRO.



**Grafico 75:** Influenza dei 3 periodi pre-arricchimento, arricchimento e post-arricchimento della forma di arricchimento giochi sulla categoria comportamentale ATTIVITA' (mediana).



**Grafico 76:** Influenza dei 3 periodi pre-arricchimento, arricchimento e post-arricchimento della forma di arricchimento giochi sulla categoria comportamentale INATTIVITA' (mediana).



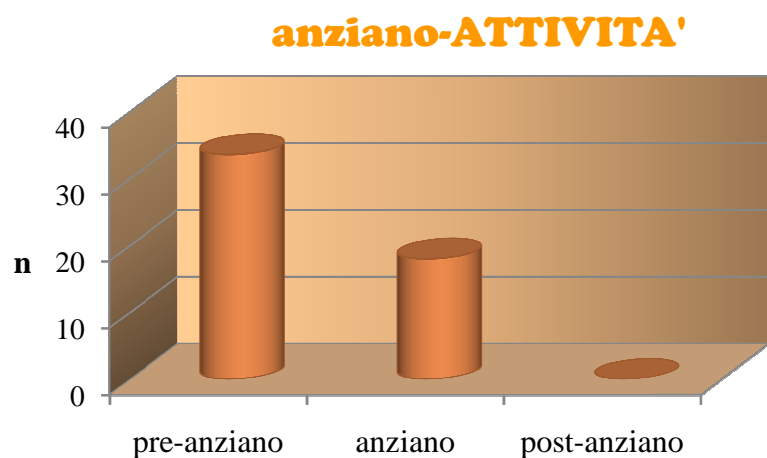
**Grafico 77:** Influenza dei 3 periodi pre-arricchimento, arricchimento e post-arricchimento della forma di arricchimento giochi sulla categoria comportamentale ALTRO (mediana).

La forma di arricchimento interazione con una persona anziana è risultata significativa per la categoria comportamentale ATTIVITA' (tabella 23).

Categoria comportamentale	Chi quadro (n=9, gl=3)	P	Coefficiente di concordanza di Kendall	Rango medio (R)
<b>ATTIVITA'</b>	6,22	0,044	0,34	0,26

**Tabella 23:** Significatività della forma di arricchimento INTERAZIONE CON UNA PERSONA ANZIANA per la categoria comportamentale ATTIVITA'.

Il grafico 78 mostra l'influenza dei 3 periodi pre-arricchimento, arricchimento e post-arricchimento della forma di arricchimento interazione con una persona anziana sulla categoria comportamentale ATTIVITA'.



**Grafico 78:** Influenza dei 3 periodi pre-arricchimento, arricchimento e post-arricchimento della forma di arricchimento interazione con una persona anziana sulla categoria comportamentale ATTIVITA' (mediana).

L'ulteriore analisi statistica effettuata sulle diverse forme di arricchimento, considerando per ognuna i 3 periodi pre-arricchimento, arricchimento e post-arricchimento, non ha evidenziato nessun risultato significativo.

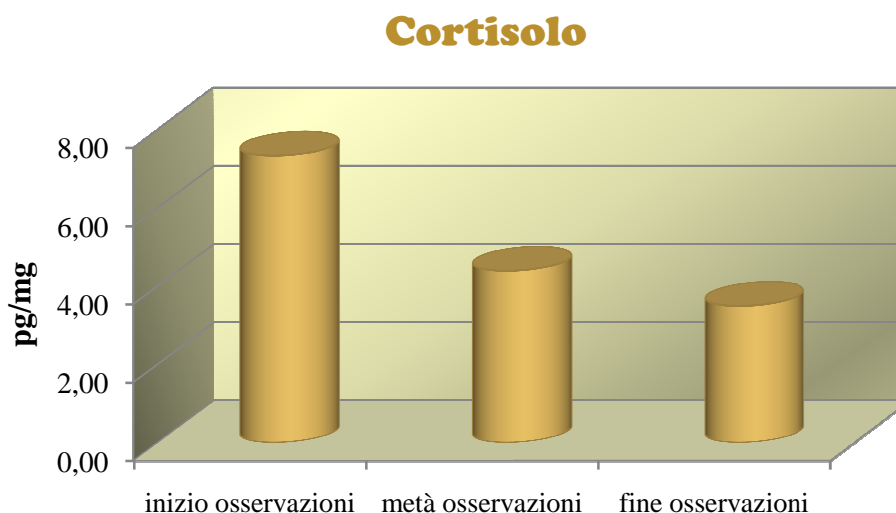
### DATI ORMONALI

Dall'analisi statistica condotta sulle concentrazioni di cortisolo rinvenute nelle feci dei cani in esame, non è emerso alcun dato significativo.

L'analisi statistica condotta sulle concentrazioni di cortisolo estratte dal pelo rasato nella regione del garrese all'inizio, a metà ed alla fine dell'intero periodo di osservazione ha evidenziato una significativa diminuzione del cortisolo (tabella 24), come mostra il grafico 79.

Chi quadro (n=9, gl=3)	P	Coefficiente di concordanza di Kendall	Rango medio (R)
11,55	0,003	0,64	0,59

**Tabella 24:** Significatività delle concentrazioni di cortisolo estratte dal pelo rasato all'inizio, a metà ed alla fine dell'intero periodo di osservazione.



**Grafico 79:** Diminuzione delle concentrazioni di cortisolo estratte dal pelo rasato all'inizio, a metà ed alla fine dell'intero periodo di osservazione (mediana).

E' evidente, dunque, che l'arricchimento ambientale fornito ai soggetti dello studio abbia determinato notevoli modificazioni del comportamento degli stessi.

Nello specifico, nel periodo corrispondente alla forma di arricchimento musica, si è riscontrata una riduzione dei moduli comportamentali (camminare, alzarsi, sedersi,

sdraiarsi, mangiare/bere, urinare/defecare, gioco da solo, gioco con cani) appartenenti alla categoria ATTIVITA'. Contrariamente a quanto ci si aspetterebbe, nello stesso periodo, si è riscontrata anche una riduzione dei comportamenti compresi nella categoria INATTIVITA' (seduto, sdraiato, dormire, fermo). La ragione di questa apparente contraddizione risiede nel fatto che i cani osservati, in questo periodo, possono aver manifestato comportamenti appartenenti ad altre categorie comportamentali risultate non significative, diversi da quelli compresi nelle 2 categorie ATTIVITA' ed INATTIVITA'. In ogni caso, l'effetto più rilevante dovuto a questa forma di arricchimento si riscontra a carico della categoria ATTEGGIAMENTI DI FUGA/SPOSTAMENTI: la musica, infatti, ha determinato un'evidente diminuzione di comportamenti quali arrampicarsi sulla porta, saltare sul muro, scavare e stare alla porta. Quanto appena descritto confermerebbe i risultati di un recente studio di Wells *et al.* (2002) in base ai quali la musica sarebbe in grado di ridurre, in cani ospitati in canile, atteggiamenti di agitazione ed incrementare, invece, atteggiamenti di rilassamento.

Per quanto riguarda i giochi, l'analisi statistica condotta mostra come questa forma di arricchimento abbia notevolmente influenzato la categoria comportamentale INATTIVITA', determinando un'evidente riduzione della frequenza di comportamenti quali seduto, sdraiato, dormire e fermo. Nello stesso periodo si è, inoltre, riscontrato un incremento dei moduli comportamentali compresi nelle categorie ATTIVITA', ATTEGGIAMENTI DI FUGA/SPOSTAMENTI ed ALTRO.

Quanto emerso da questo studio sperimentale non ci consente di concordare pienamente con quanti attribuiscono ai giochi il significato di valido strumento per il conseguimento di un maggior benessere animale, sostenendo che questa forma di arricchimento, oltre ad incrementare l'attività, sia in grado di promuovere l'esplorazione e ridurre i comportamenti anomali (Newberry, 1995). Tuttavia, ci consente di smentire la totale assenza di effetto dei giochi sul comportamento dei cani ospitati in canile, sostenuta da altri (Shepherdson *et al.*, 1998).

L'interazione con una persona giovane è l'unica forma di arricchimento, tra le diverse fornite, per la quale non si sono ottenuti risultati significativi da nessuno dei test statistici effettuati. Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che, grazie al numero relativamente limitato dei cani (circa 55) ospitati nel canile in cui si è svolto lo studio, il personale dipendente e volontario, costituito da persone giovani, riesca a dedicare, agli ospiti della struttura tempo ed attenzioni sufficienti oltre a quelli richiesti dalle quotidiane operazioni di pulizia dei box e somministrazione del pasto. I soggetti dello studio

potrebbero, per questo, aver subito l'influenza di una persona giovane in misura nettamente inferiore rispetto all'influenza esercitata, invece, da una persona anziana.

Durante il periodo di interazione con una persona anziana, infatti, risulta particolarmente evidente sia la diminuzione dei moduli comportamentali appartenenti alla categoria ATTIVITA', sia l'incremento di quelli appartenenti alla categoria INATTIVITA'. Molti studi dimostrano che il contatto con l'uomo è in grado di ridurre, nei cani, atteggiamenti di stress e di indurre atteggiamenti di rilassamento (Tuber *et al.*, 1999). La riduzione dell'ATTIVITA' e l'aumento dell'INATTIVITA' da noi riscontrati lo confermerebbero. Anche l'incremento dei comportamenti appartenenti alla categoria ATTEGGIAMENTI DI FUGA/SPOSTAMENTI potrebbe, in realtà, essere positivamente legato alla presenza dell'uomo. Dai dati raccolti, infatti, il suddetto incremento risulta essere dovuto al modulo comportamentale “stare alla porta”. Considerata la disposizione dei box del canile in cui si è svolto lo studio e la possibilità per i cani di avere un contatto visivo con i box circostanti, questo modulo comportamentale potrebbe rappresentare un tentativo, da parte dei cani, di ridurre la distanza tra sé e la persona presente in uno dei box vicini e facilitare l'interazione, come dimostrato, peraltro, in numerosi studi riguardanti l'importanza del contatto sociale interspecifico (Campbell *et al.*, 1988; Hughes *et al.*, 1989; Wells e Hepper, 2000).

Quanto ai dati ormonali, l'assenza di risultati significativi dell'analisi statistica condotta sulle concentrazioni di cortisolo rinvenute nelle feci dei cani in esame, è dipesa, probabilmente, dal numero ridotto del campione dovuto alla difficoltà di reperire sufficienti campioni di feci per ciascun cane.

La graduale riduzione delle concentrazioni di cortisolo estratte dal pelo rasato nella regione del garrese all'inizio, a metà e alla fine del periodo sperimentale, potrebbe suggerire che le diverse forme di arricchimento fornite possano aver determinato un'effettiva riduzione dei livelli di stress nei cani “arricchiti”.



## ESPERIMENTO 4: PARAMETRI ENDOCRINI CORRELATI ALLO STRESS DURANTE L'ADDESTRAMENTO IN CANI GUIDA PER CIECHI

### SCOPI

I cani guida rappresentano, insieme al bastone, l'unico ausilio di mobilità per i non vedenti e, se correttamente utilizzati, contribuiscono alla conquista di una completa mobilità e autonomia.

Il compito del cane guida è particolarmente complesso. Esso deve imparare non solo percorsi prestabiliti e caratteristici, ma deve essere in grado affrontare qualsiasi tipo di tragitto che il non vedente voglia intraprendere, evitando tutti i tipi di ostacoli che potrebbero presentarsi lungo il cammino. Il cane si trova, quindi, in un continuo stato di attenzione al fine di prevenire la collisione con qualsiasi oggetto o persona. Risulta quindi evidente che la prima caratteristica richiesta ad un cane guida è quella di possedere un buon carattere ed un'alta resistenza agli agenti stressanti.

Per raggiungere i principali obiettivi del proprio lavoro, il cane guida deve essere addestrato. Nel corso degli anni, lo studio del comportamento animale ha permesso l'applicazione di nuovi concetti riferiti a tecniche educative "gentili" che si sono evidenziate come le più idonee al raggiungimento degli obiettivi del servizio e soprattutto al rispetto delle peculiarità delle razze impiegate.

La preparazione del cane guida comporta però delle difficoltà. In altri tipi di addestramento, si sfrutta il corredo genetico dei soggetti in relazione all'impiego che si farà di essi, ma non essendoci una predisposizione genetica tale da soddisfare i requisiti occorrenti per soddisfare la preparazione del cane guida, l'addestramento viene interamente costruito sfruttando l'equilibrio delle doti caratteriali dell'animale, in cui viene instillato un crescente "senso di responsabilità" che lo porta ad inglobare nelle sue dimensioni anche quelle del partner.

Sulla base di queste considerazioni, lo scopo della presente ricerca, condotta su cani in addestramento come cani guida per non vedenti, è stato quello di determinare, durante il loro percorso educativo, le variazioni delle concentrazioni di cortisolo nel pelo e nelle feci.

---

## MATERIALI E METODI

---

### AMBIENTE DI STUDIO

La ricerca è stata condotta presso una Scuola Nazionale Cane Guida per Ciechi. La Scuola possiede alcuni riproduttori che vivono in ambiente domestico privato e, in più, si procura altri cuccioli presso vari allevamenti.

I cani sono ricoverati in boxes singoli composti da una parte coperta, parzialmente chiusa da un parchetto esterno.

L'alimentazione dei cani è di tipo secco; la somministrazione del cibo viene effettuata due volte al giorno (mattina e tardo pomeriggio). Gli animali hanno la possibilità di accedere liberamente, durante l'intera giornata, all'acqua di abbeverata contenuta in abbeveratoi posti all'interno del box e nel parchetto esterno.

La pulizia del box viene effettuata una volta al giorno. La gestione degli animali viene effettuata dal personale della Scuola.

La Scuola è dotata di una specifica area tecnica nella quale vengono simulate situazioni che richiamano il “mondo reale” per abituare i cani a tali condizioni.

La Scuola è inoltre dotata di: locale per le operazioni di pulizia, lavaggio e disinfezione di materiali ed attrezzature, locale di cucina e di preparazione dei cibi, ambulatorio veterinario, reparto di infermeria per degenze temporanee, reparto di ricovero per cuccioli, reparto di isolamento per animali di nuova introduzione e per quelli affetti da malattie infettive.

---

### SOGGETTI DELLO STUDIO

Per la ricerca sono stati utilizzati 158 cani (65 maschi e 93 femmine), di età compresa tra 60 giorni e 2 anni. Le razze a cui appartengono tali cani sono: Labrador Retriever (L), Golden Retriever (G), Golden Retriever x Labrador Retriever (GL) e Pastore Tedesco (PT).



**Figura 27:** Cuccioli di Labrador Retriever.

La tabella 25 riporta le caratteristiche dei cani utilizzati nella sperimentazione.

	<b>TOTALE</b>	<b>Labrador Retriever (L)</b>	<b>Golden Retriever (G)</b>	<b>Labrador Retriever + Golden Retriever (GL)</b>	<b>Pastore Tedesco (PT)</b>
<b>Totale cani (n°)</b>	158	91	50	6	11
<b>Maschi</b>	65	39	18	2	6
<b>Femmine</b>	93	52	32	4	5
<b>Età (anni)</b>	1.18 ± 0.05	1.18 ± 0.09	0.82 ± 0.07	1.36 ± 0.05	1.00 ± 0.38

**Tabella 25:** Caratteristiche dei cani utilizzati nella sperimentazione (media ± E.S.).

Le caratteristiche dei cani utilizzati suddivisi per periodo educativo sono riportate in tabella 26.

	<b>AFFIDAMENTO</b>	<b>ADDESTRAMENTO E ASSEGNAZIONE</b>
<b>Totale cani (n°)</b>	73	85
<b>Maschi</b>	31	37
<b>Femmine</b>	42	48
<b>Età (anni)</b>	0.79 ± 0.05	1.49 ± 0.06

**Tabella 26:** Caratteristiche dei cani utilizzati nella sperimentazione suddivisi per periodo di affidamento, addestramento ed assegnazione (media ± E.S.).

## AFFIDAMENTO-ADDESTRAMENTO-ASSEGNAZIONE

### AFFIDAMENTO

Gli animali dallo svezzamento, effettuato a circa sessanta giorni di età, fino a circa un anno di età, vengono dati in consegna a famiglie “affidatarie” volontarie che

provvedono alla socializzazione dell'animale, volta alla cura di quelle caratteristiche e abitudini che determinano le premesse per la riuscita di un buon cane guida.

Tale fase si può considerare parte dell'addestramento poiché durante questo periodo ci si propone di far familiarizzare il cane con il maggior numero possibile di situazioni quotidiane: il cucciolo partecipa ad un ampio ventaglio di attività quali andare al lavoro, fare compere in aree commerciali o supermercati, fare visita ad amici, andare al ristorante, viaggiare in autobus e viene messo a contatto con la realtà del traffico veicolare ed ai rumori ad esso connessi.

Al cucciolo vengono inoltre insegnati alcuni comandi di obbedienza di base (seduto, resta, vieni, ecc.).

I cani in affidamento rientrano mensilmente alla Scuola per un periodo di circa una settimana sia per controlli veterinari e profilassi, sia per il controllo dello sviluppo del programma di socializzazione. In secondo luogo, facendo familiarizzare il cane con l'ambiente della Scuola, si cerca di facilitarne il successivo rientro.

Grazie al ricorso a razze estremamente sociali ed agli accorgimenti che vengono adottati, si cerca di evitare al cucciolo ogni trauma.

## *ADDESTRAMENTO*

---

A circa un anno di età, i cani rientrano definitivamente nella Scuola per cominciare un addestramento specifico della durata di circa sei mesi; ciascun cane viene affidato ad un unico addestratore.

L'addestramento viene effettuato unicamente con il rinforzo positivo, lodando il cane verbalmente o con carezze quando esegue correttamente l'esercizio richiesto dall'istruttore. Nel caso di mancata riuscita dell'esercizio, il cane non viene ripreso o punito, ma si ripete la prova per un numero limitato di tentativi, due o tre, e si passa all'esercizio successivo.

Ciascuna seduta di addestramento ha una durata variabile dai 45 ai 60 minuti in relazione all'intensità della stessa.

Non esistendo una predisposizione genetica idonea a soddisfare i requisiti occorrenti per la preparazione del cane guida, l'addestramento viene interamente costruito sfruttando l'equilibrio delle doti caratteriali dell'animale cui viene instillato un crescente "senso di responsabilità" che lo porta ad inglobare nelle sue dimensioni anche quelle del partner.

Nelle prime sessioni vengono insegnati i fondamentali della guida. L'addestramento inizia nel campo ostacoli della scuola ove vengono creati diversi percorsi con ostacoli che simulano quelli normalmente presenti nelle strade. In essi il cane impara a camminare lasciando uno spazio alla propria destra tale da permettere il passaggio del suo padrone, a fermarsi se questo spazio si restringe o viene a mancare, a girare a destra ed a sinistra. Impara anche a salire le scale, a tenere lontano il suo padrone da ostacoli verticali (palo) ed ad evitare eventuali buche, quali tombini aperti.

In un secondo momento impara anche a deviare, per esempio, davanti ad una porta o una scala ed a passare attraverso porte girevoli.

A questo punto l'addestramento si sposta nel traffico cittadino dove deve mettere in pratica tutto ciò che ha appreso precedentemente. L'addestratore lo espone ai pericoli dei centri trafficati e gli insegna ad affrontare varie situazioni: fermarsi quando sopraggiunge un'auto, aggirare le auto parcheggiate lungo la via, gestirsi in luoghi molto affollati, ecc.. Il cane impara a riconoscere il ciglio dei marciapiedi anche quando sono molto bassi ed a guidare in aree prive di marciapiede.

Per quanto riguarda i semafori, il cane non impara a rispettarli a seconda del colore della luce poiché sarebbe impossibile insegnare ad un cane a distinguere il colore rosso del semaforo da quello di una qualsiasi altra insegna. Esso attraversa solo quando, sia da destra che da sinistra non sopraggiungono veicoli.

In città viene anche insegnato all'animale a servirsi dei mezzi pubblici: attendere alla fermata, salire e trovare un posto a sedere per il non vedente.

A questa fase segue l'addestramento all'interno degli edifici. Si insegna al cane ad evitare vari tipi di ostacoli come sedie, persone, ecc. e a guidare il non vedente nell'utilizzo degli ascensori, delle scale e delle scale mobili. Il cane deve anche imparare a trovare oggetti o destinazioni su comando ("trova la porta", "trova le scale", trova un posto a sedere").

Successivamente il cane viene condotto in zone a traffico più intenso ove gli viene attribuita maggior responsabilità nel gestire le varie situazioni. L'istruttore lo incita ad usare l'iniziativa ed a risolvere gli eventuali problemi che gli si pongono lungo il percorso.

Tutte le sessioni dell'addestramento vengono effettuate in modo da esporre il cane al maggior numero possibile di situazioni ambientali come, ad esempio, differenti condizioni meteorologiche, luoghi molto affollati, ristoranti, aree pubbliche di notte, zone

dove si trovano cani all'interno di giardini privati, aree molto rumorose e aree con molte distrazioni (cibo, bambini, gatti e cani).

Lo scopo finale del periodo di addestramento è la completa assimilazione da parte dell'animale che la responsabilità dell'incolumità del suo amico bipede è affidata alla sua concentrazione durante l'effettuazione del percorso.



**Figura 28:** Fase di addestramento.

### *ASSEGNAZIONE*

---

L'assegnazione avviene con lo scrupoloso rispetto di una lista di attesa. Giunta la data, non ci si può limitare a consegnare materialmente il cane all'assegnatario. Egli deve, infatti, imparare a gestirlo correttamente, senza rischi per sé, per la sua guida o per terzi, mentre il cane deve capire ed accettare il suo nuovo padrone.

Per realizzare questo indispensabile affiatamento, assistenti della Scuola mediano i contatti iniziali tra il cane ed il non vedente grazie ad un corso di una ventina di giorni che si svolge presso la Scuola stessa.

Il nuovo proprietario del cane riceve poi tutte le informazioni circa l'alimentazione, la cura e l'igiene del nuovo compagno.



**Figura 29:** Cane guida per ciechi.

## RACCOLTA E TRATTAMENTO DEL MATERIALE BIOLOGICO

Durante le fasi di affidamento e di addestramento, si è proceduto alla raccolta mensile di feci e pelo, mentre durante il periodo di assegnazione al non vedente è stata effettuata giornalmente la sola raccolta delle feci.

Il pelo è stato raccolto dalla coscia mediante rasatura effettuata con le forbici, posto in buste di plastica a chiusura ermetica, identificato (soggetto, data e regione anatomica del prelievo) e conservato a temperatura ambiente.

I campioni di feci sono stati raccolti al momento dell'emissione, prestando attenzione a che non venissero contaminati da altri escrementi presenti nel luogo in cui l'animale espletava il bisogno. Le feci sono state immediatamente poste in apposite buste di plastica, identificate per mezzo di un'etichetta recante data e ora di emissione e soggetto di appartenenza e conservate ad una temperatura di -20°C.

Sui campioni di pelo e feci sono state valutate le concentrazioni di cortisolo.

## METODI DI ANALISI

La determinazione della concentrazione di cortisolo è stata effettuata mediante le tecniche radioimmunologiche (RIA) precedentemente descritte.

## ANALISI STATISTICA

Nell'effettuare i tests statistici per saggiare eventuali differenze delle variabili considerate in relazione alla razza sono stati esclusi i cani di razza Pastore tedesco e gli incroci Golden Retriever X Labrador Retriever per l'esiguo numero di soggetti

appartenenti alle suddette razze. Sono stati quindi considerati esclusivamente i cani appartenenti alle razze Labrador Retriever e Golden Retriever.

E' stata effettuata l'analisi della varianza per campioni ripetuti considerando come variabili indipendenti le fasi formative del cane (affidamento, addestramento ed assegnazione) e la razza (Golden Retriever e Labrador Retriever). Mediante test di Duncan sono state calcolate le differenze minime significative.

L'esplorazione delle differenze fra i sessi è stata effettuata, utilizzando il test U di Mann-Whitney, nell'ambito di ciascun singolo periodo in quanto gli animali prima dell'inizio del periodo di addestramento venivano sterilizzati.

Le differenze sono state considerate statisticamente significative per  $P < 0,05$ .

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Le concentrazioni medie di cortisolo rilevate nei cani in affidamento, in addestramento e nel periodo di assegnazione, suddivisi per razza e sesso, sono riportate nelle tabelle 27-33.

<b>Cortisolo</b>	<b>AFFIDAMENTO</b>		<b>ADDESTRAMENTO</b>	
	<b>Media</b>	<b>E.S.</b>	<b>Media</b>	<b>E.S.</b>
<b>Pelo (pg/mg)</b>	5,04	0,44	4,47	0,27
<b>Feci (pg/mg)</b>	2,25	0,34	2,02	0,09

**Tabella 27:** Concentrazioni medie di cortisolo rilevate nel pelo e nelle feci di cani in affidamento ed in addestramento (media  $\pm$  E.S.).

Dalla tabella 27 si può osservare che le concentrazioni di cortisolo rilevate nel pelo, e nelle feci nel periodo di affidamento e di addestramento non differiscono significativamente pur presentando una tendenziale riduzione durante l'addestramento. Sembrerebbe quindi che l'addestramento dei cani, eseguito con le tecniche "gentili" del rinforzo non comporti una situazione di disagio per l'animale. Inoltre, questo risultato, potrebbe segnalare un probabile "effetto equilibrante" riconducibile al percorso di addestramento che tende a rendere il cane più "responsabile ed equilibrato" nei confronti di eventi improvvisi ed imprevisti.

Risulta difficile poter fare confronti con altri lavori sperimentali relativi ai livelli di cortisolo durante periodi addestrativi in quanto in bibliografia sono state riscontrate pubblicazioni che fanno riferimento ad un lavoro dove la "componente fisica" (corsa, lavoro di forza o di agilità) è predominante sulla componente "psicologica" (lavoro di



attenzione). In tutti questi lavori le concentrazioni di cortisolo, rilevate nel plasma erano maggiori nel periodo di addestramento (Preziuso e Preziuso, 2001; Radosevich *et al.*, 1989).

<b>Cortisolo</b>	<b>ADDESTRAMENTO</b>		<b>ASSEGNAZIONE</b>	
	<b>Media</b>	<b>E.S.</b>	<b>Media</b>	<b>E.S.</b>
<b>Feci (pg/mg)</b>	1,87	0,21	2,06	0,10

**Tabella 28:** Concentrazioni medie di cortisolo rilevate nelle feci di cani in addestramento e in assegnazione (media  $\pm$  E.S.).

L'ultima fase dell'addestramento prevede che il cane trascorra un periodo con il non vedente al quale verrà assegnato al fine di "insegnare", a quest'ultimo, la corretta "guida e gestione" del cane. Questo passaggio di consegne tra addestratore, persona esperta nella gestione dell'animale, e non vedente, che nella maggior parte delle volte non ha mai posseduto un cane, non sembrerebbe essere particolarmente "stressante" per l'animale; infatti, le concentrazioni di cortisolo rilevate nelle feci durante il periodo di assegnazione (ultime due settimane del periodo di addestramento), pur riscontrando un tendenziale aumento dei livelli, non sono significativamente diverse da quelle riscontrate, sempre nelle feci, nel precedente periodo di addestramento trascorso con l'addestratore.

Le differenze tra le concentrazioni di cortisolo rilevate nel pelo e nelle feci nel periodo di affidamento, addestramento e assegnazione al non vedente in relazione alla razza del cane sono riportate nelle tabelle 29 e 30.

<b>Cortisolo</b>	<b>AFFIDAMENTO</b>				<b>ADDESTRAMENTO</b>			
	<b>GOLDEN</b>		<b>LABRADOR</b>		<b>GOLDEN</b>		<b>LABRADOR</b>	
	<b>Media</b>	<b>E.S.</b>	<b>Media</b>	<b>E.S.</b>	<b>Media</b>	<b>E.S.</b>	<b>Media</b>	<b>E.S.</b>
<b>Pelo (pg/mg)</b>	4,83	0,57	4,52	0,26	4,55	0,67	4,49	0,32
<b>Feci (pg/mg)</b>	2,45	1,02	2,15	0,40	2,13	0,16	1,68	0,12

**Tabella 29:** Concentrazioni medie di cortisolo rilevate nel pelo e nelle feci di cani in affidamento ed in addestramento, relative alla razza del cane (media  $\pm$  E.S.).

Dalla tabella 29 possiamo notare differenze tra le due razze per quanto riguarda i livelli di cortisolo rilevati nelle feci; è possibile osservare una minore concentrazione di tale ormone, sia in affidamento sia in addestramento, nei cani di razza Labrador rispetto a quelli di razza Golden, però non sono stati raggiunti i livelli di significatività statistica. Analogamente, il cortisolo pilifero non mostra differenze significative in relazione alla razza in entrambi i periodi.

I cani di razza Golden si sono rivelati più timidi ed instabili emotivamente rispetto ai Labrador ricordando così l'influenza della razza sul carattere dell'animale.

<b>Cortisolo</b>	<b>ADDESTRAMENTO</b>				<b>ASSEGNAZIONE</b>			
	<b>GOLDEN</b>		<b>LABRADOR</b>		<b>GOLDEN</b>		<b>LABRADOR</b>	
	<b>Media</b>	<b>E.S.</b>	<b>Media</b>	<b>E.S.</b>	<b>Media</b>	<b>E.S.</b>	<b>Media</b>	<b>E.S.</b>
<b>Feci (pg/mg)</b>	1.35 <sup>b</sup>	0.31	2.10 <sup>a</sup>	0.24	1.81 <sup>b</sup>	0.34	2.16 <sup>a</sup>	0.41

**Tabella 302:** Concentrazioni medie di cortisolo rilevate nelle feci di cani in addestramento ed assegnazione, relative alla razza del cane (media  $\pm$  E.S.). Lettere diverse (a, b) sulla stessa riga indicano differenze significative ( $P < 0.05$ ) tra razze nei rispettivi periodi.

Dalla tabella 30 si può osservare che esiste una differente reattività di razza mentre non sono state riscontrate differenze relative al periodo. Durante il periodo di assegnazione le concentrazioni fecali di cortisolo sono significativamente maggiori nei cani di razza Labrador, rispetto a quelli di razza Golden, a dimostrazione di un maggior disagio nei cani di razza Labrador quando vi è un cambio di guida tra il conduttore e la persona non vedente.

<b>Cortisolo</b>	<b>AFFIDAMENTO</b>				<b>ADDESTRAMENTO</b>			
	<b>MASCHIO</b>		<b>FEMMINA</b>		<b>MASCHIO</b>		<b>FEMMINA</b>	
	<b>Media</b>	<b>E.S.</b>	<b>Media</b>	<b>E.S.</b>	<b>Media</b>	<b>E.S.</b>	<b>Media</b>	<b>E.S.</b>
<b>Pelo (pg/mg)</b>	4,61	0,74	5,33	0,67	3,82	0,33	5,00	0,42
<b>Feci (pg/mg)</b>	1,65 <sup>b</sup>	0,29	1,86 <sup>a</sup>	0,40	2,20 <sup>b</sup>	0,13	1,89 <sup>a</sup>	0,14

**Tabella 31:** Concentrazioni medie di cortisolo rilevate nel pelo e nelle feci di cani in affidamento ed in addestramento, relative al sesso del cane (media  $\pm$  E.S.). Lettere diverse (a, b) sulla stessa riga indicano differenze significative ( $P < 0.05$ ) tra razze nei rispettivi periodi.

Le concentrazioni di cortisolo rilevate nelle feci sono risultate influenzate dal sesso: le femmine hanno presentato concentrazioni significativamente superiori rispetto ai maschi sia durante il periodo di affidamento sia durante quello di addestramento. Analoga tendenza è stata osservata nel pelo, ma in questo campione non è stata raggiunta la significatività statistica.

<b>Cortisolo</b>	<b>ADDESTRAMENTO</b>				<b>ASSEGNAZIONE</b>			
	<b>MASCHIO</b>		<b>FEMMINA</b>		<b>MASCHIO</b>		<b>FEMMINA</b>	
	<b>Media</b>	<b>E.S.</b>	<b>Media</b>	<b>E.S.</b>	<b>Media</b>	<b>E.S.</b>	<b>Media</b>	<b>E.S.</b>
<b>Feci (pg/mg)</b>	1.45	0.54	2.42	0.61	1.68	0.36	2.51	0.42

**Tabella 32:** Concentrazioni medie di cortisolo rilevate nelle feci di cani in addestramento ed assegnazione, relative al sesso del cane (media  $\pm$  E.S.).

Per quanto attiene alle variazioni di cortisolo fecale, legate al sesso, nel periodo di assegnazione non sono state osservate differenze significative, anche se è osservabile una tendenziale maggior concentrazione fecale di tale ormone nelle femmine.

<b>Cortisolo</b>	<b>ADDESTRATORE</b>			
	<b>MASCHIO</b>		<b>FEMMINA</b>	
	<b>Media</b>	<b>E.S.</b>	<b>Media</b>	<b>E.S.</b>
<b>Pelo (pg/mg)</b>	5.45	0.54	4.48	0.38
<b>Feci (pg/mg)</b>	1.97	0.24	2.15	0.12

**Tabella 33:** Concentrazioni medie di cortisolo rilevate nel pelo e nelle feci di cani in addestramento, relative al sesso dell'addestratore (media  $\pm$  E.S.).

<b>Cortisolo</b>	<b>NON VEDENTE</b>			
	<b>MASCHIO</b>		<b>FEMMINA</b>	
	<b>Media</b>	<b>E.S.</b>	<b>Media</b>	<b>E.S.</b>
<b>Feci (pg/mg)</b>	2.36 <sup>a</sup>	1.17	1.86 <sup>b</sup>	1.16

**Tabella 34:** Concentrazioni medie di cortisolo rilevate nelle feci di cani in assegnazione, relative al sesso del non vedente (media  $\pm$  E.S.). Lettere diverse (a, b) sulla stessa riga indicano differenze significative ( $P < 0.05$ ) tra razze nei rispettivi periodi.

Nelle tabelle 33 e 34 vengono riportate le concentrazioni di cortisolo nel pelo e nelle feci nel periodo di addestramento e di assegnazione al non vedente in relazione al sesso dell'addestratore e del non vedente. Le concentrazioni pilifere e fecali di cortisolo non sono significativamente diverse in relazione al sesso dell'addestratore.

Le concentrazioni fecali di cortisolo rilevate durante il periodo di assegnazione sono significativamente superiori nei cani assegnati ad non vedenti di sesso maschile.

Fare delle ipotesi su come il sesso dell'addestratore e del non vedente possa influenzare le concentrazioni fecali di cortisolo in questo periodo risulta difficile anche alla luce dello scarso numero di lavori che indagano sugli effetti del sesso del "conduttore" del cane sulle concentrazioni di cortisolo. Hennessy *et al.* (1997) hanno rilevato che esistono differenze significative dei livelli di cortisolo in cani di canile

accuditi da personale di sesso maschile e femminile. In questo lavoro sono state osservate concentrazioni di cortisolo inferiori nei cani accuditi da personale di sesso femminile.

## ESPERIMENTO 5: MONITORAGGIO DELL'ATTIVITÀ SURRENALICA DI CANI DA UTILITÀ E DIFESA DURANTE L'ADDESTRAMENTO

### SCOPI DELLA RICERCA

L'Utilità e Difesa è una disciplina sportiva dove il binomio uomo-cane si esibisce in una serie di prove che hanno come fine quello di consentire una valutazione oggettiva delle attitudini caratteriali e fisiche del cane e l'abilità dell'uomo a sfruttare a proprio vantaggio queste doti.

Le regole e gli esercizi richiesti in queste prove di lavoro hanno subito negli anni numerose modifiche rendendole sempre più complicate, ma l'essenza finale è rimasta invariata. L'obiettivo, infatti, è la ricerca e la selezione di soggetti dotati sì, di forti impulsi caratteriali, ma anche di grande stabilità nervosa.

Nelle prove di Utilità e Difesa il cane è impegnato sia a livello fisico che psichico; queste due componenti rappresentano per il cane fonte di stress.

L'atleta impara a gestire questo stress attraverso un corretto addestramento ed allenamento; quest'ultimo si può definire come un processo educativo che si concretizza con l'organizzazione dell'esercizio fisico, ripetuto in quantità ed intensità tali da produrre carichi progressivamente crescenti, atto a migliorare le capacità fisiche, psichiche e tecniche e a consolidarne il rendimento in gara (performance) (Mariani *et al.*, 1997). La preparazione del cane prevede un addestramento specifico dove l'animale dovrà apprendere e fissare comportamenti del tutto nuovi, sviluppando contemporaneamente doti atletiche non indifferenti. Durante l'addestramento, infatti, il cane impara ad eseguire compiti complessi, in cui però la sua libertà di esprimere i comportamenti di specie è imbrigliata in una sequenza artificialmente controllata dall'uomo e priva di un significato etologico. Tutto ciò genera stress psicofisici ed è per questo che risulta fondamentale il corretto e ottimale lavoro dell'uomo affinché il cane possa adattarsi senza che ne venga compromesso il suo benessere.

Le prove di Utilità e Difesa si compongono di 3 sezioni, "A", "B" e "C":

- **SEZIONE "A"** – Prova di fiuto. Il cane deve seguire, usando l'olfatto, una traccia lasciata dal passaggio di una persona estranea o del conduttore e ritrovare e segnalare un numero prestabilito di piccoli oggetti abbandonati dal tracciante. Questo

esercizio serve soprattutto per controllare il senso del fiuto nel soggetto giudicato, ma anche altre doti come il temperamento, la tempra, la capacità di discernimento, ecc.

- **SEZIONE “B”** – Prova di obbedienza. Il cane deve eseguire una sequenza d’esercizi di dressage più o meno complessi, dimostrando la propria capacità d’apprendimento, la docilità, il temperamento, ma anche la tempra, ecc.

- **SEZIONE “C”** – Prova di difesa. In questa sezione il cane deve eseguire correttamente la ricerca e la localizzazione del figurante, la sua segnalazione al conduttore (attraverso il solo comportamento d’abbaio) e deve inoltre, saper difendere sé stesso ed il conduttore dagli attacchi sferrati dal figurante ed attaccarlo a sua volta, dimostrando il possesso di doti come l’aggressività controllata, la tempra, il coraggio e la sicurezza di sé.

In letteratura non esistono lavori specifici che valutino l’attività dell’asse ipotalamo-ipofisi-surrene in cani impegnati nell’addestramento a livello agonistico per le prove di Utilità e Difesa.

Sulla base di queste considerazioni, lo scopo di questo studio è stato quello di determinare parametri endocrini relativi ai “livelli di stress” a cui tali cani vengono sottoposti durante l’addestramento cercando di evidenziare nel contempo, utilizzando una metodica meno invasiva possibile, un rapporto tra programmi di lavoro differenti e attività della corteccia surrenale.



**Figura 30:** Cani durante una gara di Utilità e difesa.

## MATERIALI E METODI

### AMBIENTE DI STUDIO

Lo studio è stato effettuato presso un campo di addestramento riconosciuto ufficialmente dal club specializzato nella tutela della razza Pastore Tedesco e sotto il controllo dell'E.N.C.I. (Ente Nazionale della Cinofilia Italiana).

Il campo è situato su una superficie di circa un ettaro di terreno che comprende: uffici, ampio parcheggio, campo di addestramento recintato e ampia area perimetrale adibita allo svago dei cani. Il campo di addestramento ha dimensioni ufficialmente riconosciute (80×60 metri) ed è dotato della classica attrezzatura per il lavoro degli animali (palizzata, salto e nascondigli per il figurante). Il fondo del campo e dell'area perimetrale è costituito da manto erboso che viene curato scrupolosamente garantendo ai cani e alle persone maggiore sicurezza durante l'attività sportiva. L'area adibita all'addestramento è illuminata permettendo di svolgere l'attività anche nelle ore serali.

### SOGGETTI DELLO STUDIO

Per lo studio sono stati utilizzati 15 cani (12 maschi e 3 femmine) appartenenti a 3 razze: Pastore Tedesco (n=12), Rottweiler (n=2) e Dobermann (n=1). L'età degli animali è compresa tra 2 e 7 anni. Tutti i soggetti sono interi.

Nella tabella 33 vengono riportate le caratteristiche dei cani utilizzati nella sperimentazione.



**Figura 31:** Foto di 2 dei soggetti dello studio

La carriera sportiva del cane da Utilità e Difesa si può suddividere in tre grandi fasi: periodo giovanile, periodo di addestramento e periodo di mantenimento. È



naturalmente semplicistico fare una suddivisione così sommaria in quanto non vi è un limite netto ed evidente che separi queste varie fasi. Inoltre, il calendario delle gare influenza notevolmente il carico di lavoro sia per quei soggetti che oramai hanno raggiunto il massimo livello di preparazione, sia per quelli che devono superare le prime classi IPO (Internazionale Profungs Ordnung). In prossimità di una prova, infatti, si intensifica l'allenamento fisico e si richiede un lavoro più corretto e preciso da parte del cane.

Considerando quanto sopra esposto, i soggetti in esame sono stati suddivisi in due categorie differenti: IPO-0 e IPO-3. Gli animali appartenenti al gruppo IPO-0 sono soggetti privi di brevetti IPO mentre, quelli del gruppo IPO-3 sono, al momento della sperimentazione, già in possesso del massimo livello di addestramento (brevetto IPO-3). Questi due gruppi hanno seguito, durante il periodo di campionamento, due diversi programmi di addestramento che in seguito verranno descritti dettagliatamente.

È importante ricordare che i comportamenti manifestati durante il lavoro non dipendono solo dalle attitudini del cane, ma anche dalle capacità comunicative del proprietario/conducente.

	<b>TOTALE</b>	<b>Pastore Tedesco</b>	<b>Rottweiler</b>	<b>Dobermann</b>
<b>Totale cani (n°)</b>	15	12	2	1
<b>Maschi interi</b>	12	10	1	1
<b>Femmine intere</b>	3	2	1	0
<b>Età (anni)</b>	4.30 ± 0.43	4.56 ± 1.54	3.37 ± 0.48	3.02 ± 0.00
<b>Classe IPO</b>				
<b>Nessuna (IPO-0)</b>	6	4	1	1
<b>IPO 3</b>	9	8	1	0

**Tabella 33:** Caratteristiche dei cani utilizzati nella sperimentazione (media ± E.S.).

## DISEGNO SPERIMENTALE

### ADDESTRAMENTO

Durante il periodo di campionamento, della durata di 4 mesi (settembre – dicembre), i soggetti dello studio hanno seguito un programma di addestramento differente a seconda del livello di preparazione raggiunto. I piani di lavoro suddetti sono stati fondamentalmente di due tipi e definiti con la sigla IPO-0 e IPO-3.



Il programma IPO-3 è stato condotto su tutti i cani già in possesso di tale classe di addestramento ed aveva come obiettivo la preparazione dei soggetti al Campionato Italiano di Utilità e Difesa. Dopo questa competizione il piano di lavoro di questi soggetti, prevedeva una riduzione dell'intensità degli allenamenti settimanali, al fine di mantenere il livello di tonicità psico-fisica raggiunto. Questi due periodi, caratterizzati da una diversa intensità degli allenamenti, sono stati definiti come: "periodo 1", che è l'intervallo di tempo del campionamento che va dal giorno zero alla data della manifestazione sopraccitata e "periodo 2", che va dalla fine del primo periodo alla fine della sperimentazione.

Il secondo programma (IPO-0) è stato seguito da quei soggetti che, durante il periodo di campionamento, non possedevano alcun brevetto di lavoro. L'iter operativo, durante tutto l'intervallo di tempo della sperimentazione, è risultato costante; questi soggetti, infatti, non hanno affrontato nessuna competizione sportiva tale da giustificare, come per il gruppo precedente, un'intensificazione lavorativa (pre-agonistica) e una successiva riduzione della stessa. Per questo motivo sia durante il periodo 1 che durante il periodo 2 (del programma IPO-3), l'intensità degli allenamenti, per questi soggetti, ha subito solo minime variazioni.

Di seguito vengono descritti i suddetti programmi di lavoro.

#### *PROGRAMMA IPO-0*

---

I soggetti che durante il campionamento hanno seguito questo programma sono stati 6. In questi cani il programma di lavoro aveva come obiettivo quello di creare le giuste motivazioni in tutte e tre le sezioni, introducendo gradualmente l'insegnamento degli esercizi di base più semplici e, via via, di quelli più complessi. Le sedute di addestramento di questi soggetti sono state brevi (5-10 minuti) per non affaticare eccessivamente sia la componente sensoriale sia quella motoria.

Il lavoro di fiuto è stato motivato ed appreso attraverso l'utilizzo di rinforzi positivi, costituiti da cibo molto appetibile offerto al cane solo in tali circostanze. Questi rinforzi venivano depositati sulla traccia generata dal calpestamento del terreno da parte del proprietario. Le piste, effettuate con una frequenza di circa due a settimana, erano lunghe non più di 100-150 passi.

Il lavoro di obbedienza è stato effettuato nel campo di addestramento ed è stato basato principalmente sullo sviluppo dell'istinto predatorio del cane nei confronti di oggetti inanimati come palline e "salamotti di iuta". Il fine di questo lavoro è stato quello

di generare un forte impulso motivazionale tale da rendere questi oggetti, per il cane, rinforzi positivi. La frequenza di questi allenamenti è stata di circa due a settimana. Di tanto in tanto poi si procedeva all'insegnamento degli esercizi di obbedienza richiesti dal regolamento delle prove di Utilità e Difesa; questi ultimi venivano appresi dai cani singolarmente, riunendoli di tanto in tanto in sequenze parziali al fine di avvicinarli gradualmente al lavoro completo di gara.

Il lavoro di difesa, effettuato sempre al campo di addestramento, seguiva le sedute di obbedienza dopo un sufficiente intervallo di tempo atto a garantire il recupero delle energie da parte del cane. Nella difesa i cani venivano stimolati dal figurante al fine di sviluppare il loro istinto predatorio; il conduttore invece, partecipava a questa fase, inserendo gradualmente l'insegnamento dei principali comandi di controllo. Attraverso quest'addestramento i cani imparavano a manifestare i propri istinti, solo sotto il consenso del conduttore.

#### *PROGRAMMA IPO-3*

---

I soggetti che durante il campionamento hanno subito questo programma sono stati i 9 già in possesso del brevetto IPO-3. In questi soggetti il lavoro nelle tre sezioni è stato costituito principalmente da simulazioni di gara, al fine di rendere sempre più precisa l'esecuzione degli esercizi già singolarmente ben appresi. Naturalmente non si richiedeva sempre l'intera sequenza del regolamento, ma una parte di esso o addirittura, solo la ripetizione di singoli esercizi soprattutto quando non erano correttamente eseguiti. Durante gli allenamenti poi, non si facevano mai mancare ai cani i giusti rinforzi, al fine di mantenere una adeguata motivazione al lavoro. Come nel programma IPO-0, anche in questo, il lavoro di obbedienza è stato spesso associato nello stesso giorno a quello di difesa. La frequenza dell'attività sportiva settimanale è stata di circa 3 o più volte per ogni singola sezione ed è aumentata in prossimità del Campionato Italiano di Utilità e Difesa (periodo 1). Dopo tale manifestazione, come già esposto in precedenza, questo programma prevedeva una riduzione sensibile degli allenamenti (periodo 2).

---

#### **RACCOLTA E TRATTAMENTO DEL MATERIALE BIOLOGICO**

Durante il periodo sperimentale sono stati effettuati sui cani campionamenti di pelo e feci.

Il pelo è stato raccolto all'inizio e alla fine del periodo di campionamento su tutti i cani. Il taglio del pelo, per entrambi i prelievi, è stato eseguito nella stessa regione sternale o toracica laterale e ha interessato un'area del diametro circa di 10 centimetri. Il pelo raccolto è stato posto in buste di plastica a chiusura ermetica, identificato (soggetto, data, regione anatomica di prelievo) e conservato a temperatura ambiente in attesa di essere analizzato.

Le feci sono state raccolte con frequenza giornaliera, direttamente dai proprietari, immediatamente dopo la loro evacuazione durante i quattro mesi di lavoro. Le feci sono state poste in sacchetti di plastica e identificate con il nome del soggetto, data e ora di prelievo. I risultati dei lavori di Schatz e Palme (2001) hanno dimostrato che i picchi di maggior concentrazione di cortisolo nelle feci, dopo somministrazione dello stesso in forma radiomarcata per via endovenosa, si verificano nel cane dopo  $24 \pm 4$  ore. Basandosi su questi lavori è stato richiesto ai proprietari dei cani di indicare sul campione, attraverso particolari codici, l'attività svolta dall'animale il giorno prima. La lettera "A" indicava il lavoro di fiuto, la "B" il lavoro di obbedienza, la "C" il lavoro di difesa e la "R" per segnalare il riposo dal punto di vista sportivo. Queste lettere erano seguite da numeri che rappresentavano l'intensità del lavoro psicofisico svolto (1 = lavoro leggero e 2 = lavoro intenso). Quest'ultima valutazione è stata sempre effettuata dalla stessa persona. Naturalmente ogni attività "extra" dell'animale, cioè al di fuori della sua normale e quotidiana abitudine, veniva segnalata. Tutti i campioni di feci sono stati conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento delle analisi.

Sui campioni di pelo e di feci sono state valutate le concentrazioni di cortisolo.

---

## METODI DI ANALISI

La determinazione della concentrazione di cortisolo è stata effettuata mediante le tecniche radioimmunologiche (RIA) precedentemente descritte.

---

## ANALISI STATISTICA

Al fine di evidenziare le eventuali differenze tra i livelli fecali e piliferi di cortisolo durante l'attività di addestramento, i risultati ottenuti sono stati analizzati mediante l'analisi della varianza per dati ripetuti. Mediante il test di Duncan sono state calcolate le differenze minime significative.

Sono stati effettuati test di correlazione a ranghi di Spearman per l'esplorazione delle associazioni tra le concentrazioni fecali di cortisolo ed il loro contenuto nel pelo.

Le differenze sono state considerate statisticamente significative per  $P < 0,05$ .

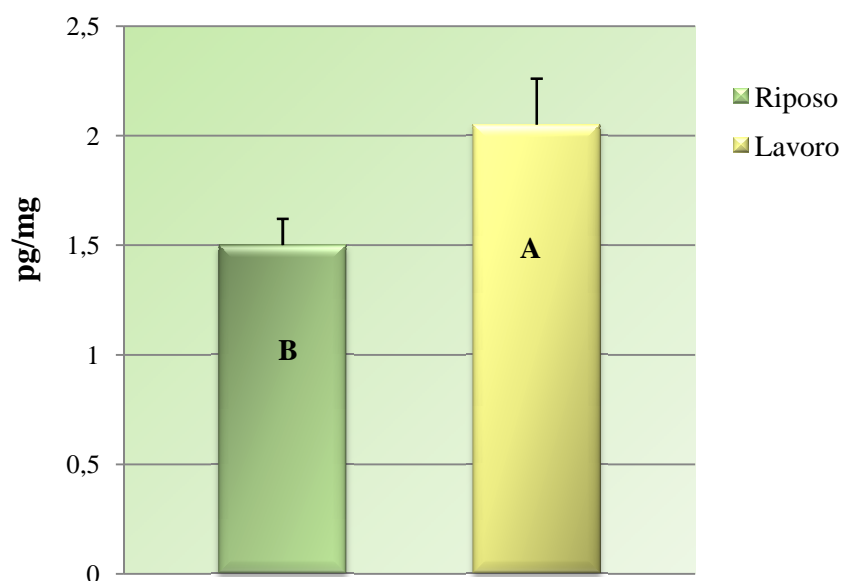
## RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati relativi alle concentrazioni fecali di cortisolo sono riportati nelle tabelle 34 - 43.

Nella tabella 34 sono riportati i livelli ormonali riscontrati durante le sedute di addestramento e nelle giornate di “riposo”. Si può osservare come l'esercizio psico-fisico comporti un aumento significativo delle concentrazioni fecali di cortisolo rispetto al riposo (grafico 80). L'aumento dei livelli di cortisolo nelle feci è da imputare alla maggior attività surrenalica dovuta al lavoro psico-fisico a cui sono stati sottoposti i cani nelle sedute di addestramento. L'aumento della concentrazione di cortisolo fecale rilevato durante l'attività fisica concorda con i risultati dell'unico lavoro, pressoché analogo alla nostra ricerca, riscontrato in bibliografia (Preziuso e Preziuso, 2001). In questa ricerca, infatti, venivano rilevate le concentrazioni ematiche di cortisolo, oltre che di lattato, in cani sottoposti ad attività fisiche come prove di attacco (simile alla prova di difesa nella disciplina da noi considerata), di corsa su pista e di caccia. Analogamente a quanto osservato nei nostri soggetti, dopo lo sforzo fisico, i cani presentavano un aumento delle concentrazioni di cortisolo.

<b>Feci</b>	<b>RIPOSO</b>	<b>LAVORO</b>
<b>Cortisolo (pg/mg)</b>	$1,50 \pm 0,12^B$	$2,05 \pm 0,21^A$

**Tabella 34:** Concentrazioni medie di cortisolo rilevate nelle feci di cani dopo il riposo e dopo il lavoro (media  $\pm$  E.S.). Lettere diverse (A, B) indicano differenze significative ( $P < 0.05$ ).

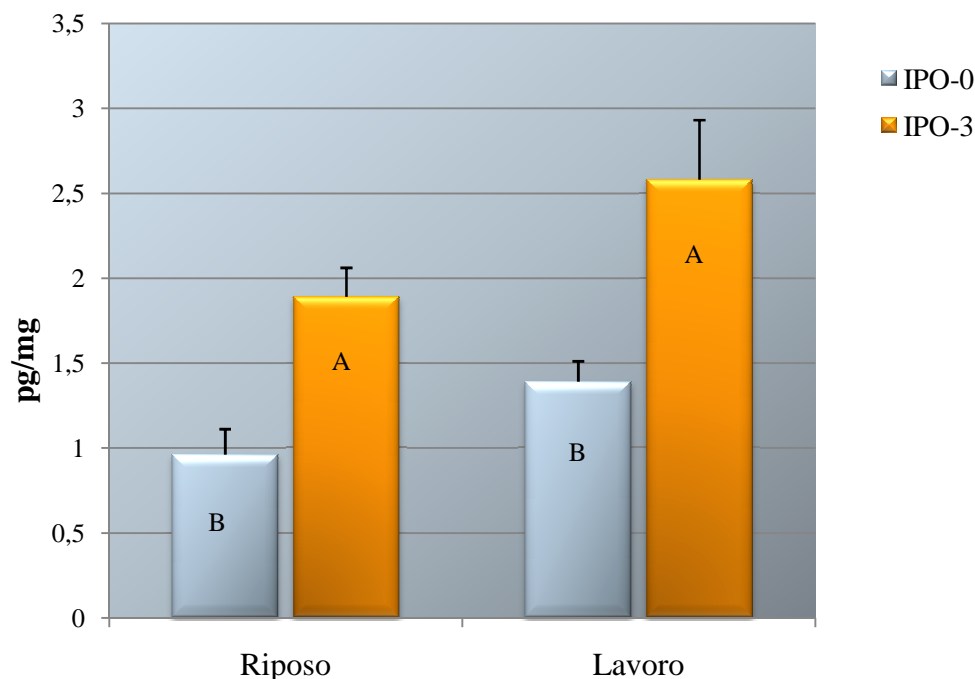


**Grafico 80:** Concentrazioni medie di cortisolo rilevate nelle feci di cani dopo il riposo e dopo il lavoro (media  $\pm$  E.S.). Lettere diverse (A, B) indicano differenze significative ( $P < 0.05$ ).

I livelli “basali” di cortisolo riscontrati durante il riposo e l’addestramento sono diversi anche in funzione del programma IPO sostenuto dai cani (tabella 35). Gli animali che seguivano il programma IPO-3 hanno presentato, sia in condizioni di riposo sia di lavoro, concentrazioni fecali di cortisolo significativamente maggiori ( $P < 0,01$ ) rispetto agli animali che sostenevano il secondo programma di addestramento (IPO-0) (grafico 81). Questi ultimi soggetti sono stati sottoposti, infatti, ad un carico di lavoro più “leggero” rispetto agli animali del programma IPO-3, i quali, invece, hanno sostenuto un lavoro più intenso che aveva come obiettivo la loro preparazione al Campionato Italiano di Utilità e Difesa.

Feci	RIPOSO		LAVORO	
	IPO-0	IPO-3	IPO-0	IPO-3
<b>Cortisolo (pg/mg)</b>	$0,96 \pm 0,15^B$	$1,89 \pm 0,17^A$	$1,39 \pm 0,12^B$	$2,58 \pm 0,35^A$

**Tabella 35:** Concentrazioni medie di cortisolo rilevate nelle feci di cani dopo il riposo e dopo il lavoro relative al programma di addestramento sostenuto (media  $\pm$  E.S.). Lettere diverse (A, B) indicano differenze significative ( $P < 0.05$ ).



**Grafico 81:** Concentrazioni medie di cortisolo rilevate nelle feci di cani dopo il riposo e dopo il lavoro in relazione al programma di addestramento sostenuto (media  $\pm$  E.S.). Lettere diverse (A, B) indicano differenze significative ( $P<0.05$ ).

Il confronto tra i soli maschi, come si evidenzia nella tabella 36, conferma quanto precedentemente detto: i maschi del gruppo IPO-3, sia a riposo che durante il lavoro, presentano livelli significativamente ( $P<0,01$ ) superiori di quelli dei cani del gruppo IPO-0.

Feci	IPO-3		IPO-0			
	Riposo	Lavoro	Riposo		Lavoro	
	Maschio	Maschio	Maschio	Femmina	Maschio	Femmina
<b>Cortisolo (pg/mg)</b>	$1,89 \pm 0,17^A$	$2,58 \pm 0,35^A$	$0,84 \pm 0,21^B$	$1,20 \pm 0,15$	$0,82 \pm 0,12^B$	$1,65 \pm 0,15$

**Tabella 36:** Concentrazioni medie di cortisolo rilevate nelle feci dei due gruppi di cani a differente programma di lavoro in relazione all'attività psico-fisica svolta (riposo, lavoro) e al sesso (media  $\pm$  E.S.). Lettere diverse (A, B) indicano differenze significative ( $P<0.01$ ).

Nella tabella 37 sono state riportate le concentrazioni di cortisolo confrontando il riposo con il lavoro in relazione con il tipo di programma sostenuto dai cani. Negli animali di entrambi i gruppi è stato osservato un aumento significativo ( $P<0,01$ ) dei livelli fecali di cortisolo.

Feci	IPO-0		IPO-3	
	Riposo	Lavoro	Riposo	Lavoro
<b>Cortisolo (pg/mg)</b>	$0,96 \pm 0,15^B$	$1,39 \pm 0,12^A$	$1,89 \pm 0,17^B$	$2,58 \pm 0,35^A$

**Tabella 37:** Concentrazioni medie di cortisolo rilevate nelle feci dei due gruppi di cani sottoposti a differenti programmi di lavoro in relazione all'attività psico-fisica svolta (riposo, lavoro) (media  $\pm$  E.S.). Lettere diverse (A, B) indicano differenze significative ( $P < 0,01$ ).

Volendo, anche in questo caso, analizzare questo risultato in funzione del sesso (tabella 36) vediamo come nei cani maschi del gruppo IPO-0 non sono state riscontrate differenze tra le concentrazioni di cortisolo rilevate a riposo o dopo il lavoro mentre nelle femmine abbiamo riscontrato un significativo ( $P < 0,05$ ) aumento del cortisolo fecale (tabella 36).

A conferma dell'influenza del lavoro di addestramento, sulle concentrazioni fecali di cortisolo, sono i dati osservabili nelle tabelle 38 e 39. In queste tabelle sono riportati i livelli fecali di cortisolo dei due gruppi di cani (IPO-0 e IPO-3) in relazione al periodo 1 e 2. Come già detto precedentemente, per gli animali a *iter* operativo IPO-3, il periodo 1 corrisponde alla fase di lavoro particolarmente intensa, in funzione della loro partecipazione al Campionato Italiano di Utilità e Difesa. Il periodo 2, invece, è stato finalizzato al mantenimento del grado di “tonicità psico-fisica” raggiunto dai cani ed è stato quindi considerato, dagli addetti ai lavori, “blando”. I cani che hanno seguito il programma IPO-0 dove il lavoro, nei due differenti periodi, è stato costante; sono stati considerati una sorta di “controllo” delle conseguenze endocrine dell'addestramento e sono serviti anche al fine di escludere un eventuale effetto “tempo” sulle variazioni delle concentrazioni fecali di cortisolo; quest'ormone, infatti, presenta oltre ad un ritmo circadiano, un ritmo circannuale (Millspaugh e Washburn, 2004).

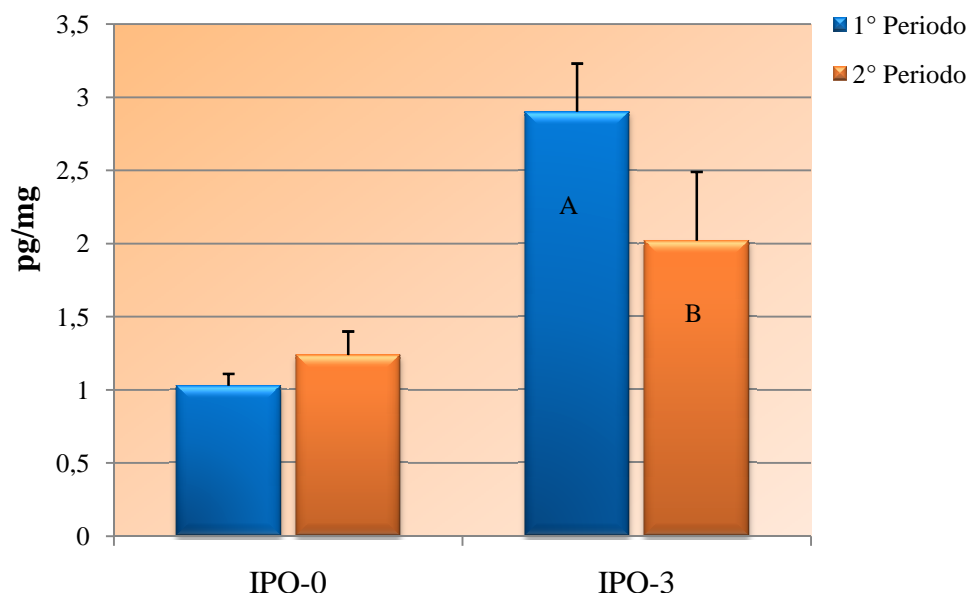
Feci	IPO-0		IPO-3	
	Periodo 1	Periodo 2	Periodo 1	Periodo 2
<b>Cortisolo (pg/mg)</b>	$1,03 \pm 0,08$	$1,24 \pm 0,16$	$2,90 \pm 0,33^A$	$2,02 \pm 0,47^B$

**Tabella 38:** Concentrazioni medie di cortisolo rilevate nelle feci di cani (sia dopo il riposo che dopo il lavoro) durante il periodo 1 e il periodo 2 relative al programma di addestramento sostenuto (media  $\pm$  E.S.). Lettere diverse (A, B) indicano differenze significative ( $P < 0,05$ ).

Feci	RIPOSO		LAVORO	
	IPO-0	IPO-3	IPO-0	IPO-3
<b>Periodo 1</b> <b>Cortisolo(pg/mg)</b>	0,77±0,08	2,83±0,38 <sup>A</sup>	1,30±0,14	2,95±0,49 <sup>A</sup>
<b>Periodo 2</b> <b>Cortisolo(pg/mg)</b>	1,11±0,25	1,38±0,14 <sup>B</sup>	1,48±0,19	1,91±0,41 <sup>B</sup>

**Tabella 39:** Concentrazioni medie di cortisolo rilevate nelle feci di cani nel periodo di riposo e di lavoro durante il periodo 1 e il periodo 2 relative al programma di addestramento sostenuto (media ± E.S.). Lettere diverse (A, B) indicano differenze significative ( $P < 0.05$ ).

Analizzando i risultati delle concentrazioni di cortisolo nel primo e secondo periodo di addestramento, possiamo osservare che si verifica una riduzione significativa dei livelli fecali di cortisolo nei cani IPO-3, nel periodo caratterizzato dal lavoro più leggero. Invece, gli animali IPO-0 non hanno presentato differenze delle concentrazioni di cortisolo nei due periodi (grafico 82). Le concentrazioni di cortisolo nel gruppo IPO-0, uguali nei due periodi, escludono un possibile "effetto tempo" sulle variazioni del suddetto ormone nel periodo sperimentale.



**Grafico 82:** Concentrazioni medie di cortisolo rilevate nelle feci di cani IPO-0 e IPO-3 (a riposo e dopo il lavoro) in relazione ai due periodi sperimentali (media ± E.S.). Lettere diverse (A, B) indicano differenze significative ( $P < 0.05$ ).



L'intensità del lavoro svolto ha influenzato le concentrazioni di cortisolo: il lavoro intenso ha determinato un aumento significativo ( $P < 0,01$ ) dei livelli fecali (tabella 40).

<b>Feci</b>	<b>LAVORO</b>	
	<b>Leggero</b>	<b>Intenso</b>
<b>Cortisolo (pg/mg)</b>	$1,63 \pm 0,19^B$	$2,52 \pm 0,37^A$

**Tabella 40:** Concentrazioni medie di cortisolo rilevate nelle feci di cani (dopo il lavoro) relative all'intensità psico-fisica svolta (media  $\pm$  E.S.). Lettere diverse (A, B) indicano differenze significative ( $P < 0,01$ ).

Ponendo in relazione l'intensità delle sedute di addestramento con i due diversi programmi di lavoro svolti dai cani (IPO-0 e IPO-3), si può notare che nei soggetti IPO-3 si ha un aumento significativo ( $P < 0,01$ ) dei livelli di cortisolo fecale nelle sedute di lavoro intenso; ciò non si verifica nei cani IPO-0 (tabella 41).

<b>Feci</b>	<b>LAVORO</b>			
	<b>Leggero</b>		<b>Intenso</b>	
	<b>IPO-3</b>	<b>IPO-0</b>	<b>IPO-3</b>	<b>IPO-0</b>
<b>Cortisolo (pg/mg)</b>	$1,97 \pm 0,39^B$	$1,37 \pm 0,14$	$3,03 \pm 0,52^A$	$1,44 \pm 0,22$

**Tabella 41:** Concentrazioni medie di cortisolo rilevate nelle feci di cani dopo il lavoro leggero e intenso, relative al programma di addestramento sostenuto (media  $\pm$  E.S.). Lettere diverse (A, B) indicano differenze significative ( $P < 0,01$ ).

Se l'intensità del lavoro svolto ha modificato i livelli fecali degli ormoni steroidei considerati, la tipologia di lavoro svolto nelle sessioni di addestramento non sembra avere influenza sugli stessi; infatti, non sono state riscontrate differenze significative tra le concentrazioni fecali di cortisolo in relazione al lavoro di fiuto, obbedienza o difesa (tabella 42).

<b>Feci</b>	<b>TIPOLOGIA DI LAVORO</b>		
	<b>Fiuto</b>	<b>Obbedienza</b>	<b>Difesa</b>
<b>Cortisolo (pg/mg)</b>	$2,12 \pm 0,32$	$1,82 \pm 0,36$	$1,54 \pm 0,57$

**Tabella 42:** Concentrazioni medie di cortisolo rilevate nelle feci di cani (dopo il lavoro) relative al tipo di attività sostenuta (media  $\pm$  E.S.).

In tabella 43 sono riportate le concentrazioni di cortisolo rilevate nel pelo all'inizio e alla fine della sperimentazione. Le concentrazioni ormonali rilevate in quest'ultimo

campione biologico, che rappresenta la ricrescita avvenuta durante il periodo sperimentale, dovrebbe rispecchiare la situazione dell'intero periodo andando ad integrare e confermare i risultati ottenuti con il dosaggio ormonale dalle feci.

<b>Pelo</b>	<b>TUTTI I CANI</b>	
	<b>Inizio sperimentazione</b>	<b>Fine sperimentazione</b>
<b>Cortisolo (pg/mg)</b>	$2,59 \pm 0,34^B$	$3,46 \pm 0,65^A$

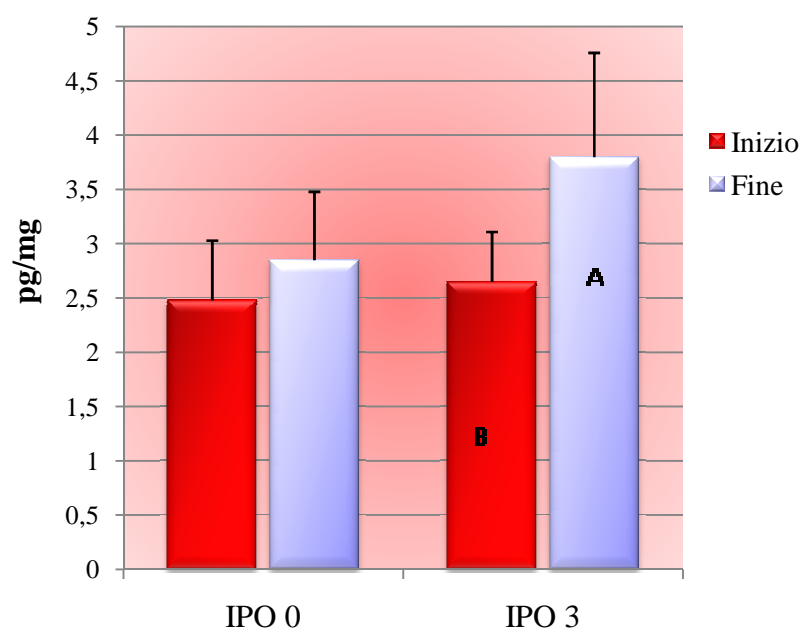
**Tabella 43:** Concentrazioni medie di cortisolo rilevate nel pelo di tutti i cani relative a inizio e fine sperimentazione (media  $\pm$  E.S.). Lettere diverse (A, B) indicano differenze significative ( $P < 0,01$ ).

La concentrazione di cortisolo nel pelo al termine del periodo sperimentale è significativamente ( $P < 0,01$ ) superiore a quella rilevata all'inizio della prova. Questo risultato confermerebbe i dati ottenuti dal dosaggio fecale. I valori di cortisolo riscontrati nel pelo di ricrescita, durante il periodo sperimentale, sono correlati significativamente ( $P < 0,01$ ) con quelli determinati nelle feci.

Relazionando i livelli di cortisolo nel pelo all'inizio ed alla fine della sperimentazione con il tipo di programma IPO seguito (tabella 44), si possono fare le seguenti considerazioni. Gli animali IPO-0, con un lavoro costante e "blando" durante tutto il periodo sperimentale, hanno presentato nei campioni prelevati all'inizio e in quelli prelevati alla fine, valori simili di cortisolo; gli animali IPO-3 invece, che durante il periodo sperimentale sono stati sottoposti ad un aumento dell'intensità di addestramento ai fini della preparazione al Campionato Italiano, hanno presentato un aumento significativo del cortisolo pilifero al termine della sperimentazione (grafico 83).

<b>Pelo</b>	<b>Inizio sperimentazione</b>		<b>Fine sperimentazione</b>	
	<b>IPO-0</b>	<b>IPO-3</b>	<b>IPO-0</b>	<b>IPO-3</b>
<b>Cortisolo (pg/mg)</b>	$2,48 \pm 0,55$	$2,65 \pm 0,46^B$	$2,85 \pm 0,63$	$3,80 \pm 0,96^A$

**Tabella 44:** Concentrazioni medie di cortisolo rilevate nel pelo di cani a inizio e fine sperimentazione relative al programma di lavoro sostenuto (IPO-0 e IPO-3) (media  $\pm$  E.S.). Lettere diverse (A, B) indicano differenze significative ( $P < 0,05$ ).



**Grafico 83:** Concentrazioni medie di cortisolo rilevate nel pelo di cani dei gruppi IPO-3 e IPO-0 relative a inizio e fine sperimentazione (media  $\pm$  E.S.). Lettere diverse (A, B) indicano differenze significative ( $P < 0.05$ ).

## CONCLUSIONI

Per il cane il poter esprimere i comportamenti intrinseci del suo patrimonio genetico fa parte del soddisfacimento dei bisogni vitali, come il mangiare, ma, spesso, purtroppo, a causa dell'influenza dell'uomo si trova a dover sopprimere completamente gli impulsi per lui spontanei.

In questo studio abbiamo preso in considerazione varie contesti in cui i cani possono trovarsi e abbiamo valutato le risposte di adattamento e i possibili miglioramenti che possiamo apportare per aiutarli a far fronte alla situazione.

I risultati dell'esperimento 1, condotto su cani di proprietà e di canile, concorrono alla individuazione dei livelli "fisiologici" di cortisolo nel pelo di cani che vivono in realtà diverse sia dal punto di vista ambientale che "gestionale". Le femmine intere hanno presentato i livelli di cortisolo più alti. Il confronto tra i cani di canile e quelli di proprietà non ha messo in luce differenze.

Per quanto riguarda i cani dei canili è emerso che i soggetti che hanno la possibilità di un "maggior movimento" e quindi di intrattenere rapporti sociali con più animali hanno un'attività minore dell'HPA. Lo stesso vale anche per i cani di proprietà, infatti, quelli che vivono in appartamento presentano i livelli più alti di cortisolo pilifero. Questo risultato induce a riflettere sul rispetto delle esigenze fisiologiche del cane.

Nell'esperimento 2 e 3 abbiamo analizzato gli effetti di diverse forme di arricchimento ambientale, confrontando osservazioni comportamentali e livelli ormonali.

I risultati delle osservazioni comportamentali hanno messo in evidenza che l'arricchimento ambientale fornito ai soggetti dello studio ha esercitato un'influenza positiva sul comportamento degli stessi ed il riscontro della graduale riduzione dei livelli di cortisolo nei campioni di pelo rasato lo ha confermato.

Questi risultati vanno comunque valutati tenendo presente il numero ridotto di animali esaminati. Tuttavia, da queste ricerche sono scaturite preziose informazioni sulle possibilità di miglioramento del benessere dei cani ospitati nei canili.

I risultati dell'esperimento 4 fanno emergere che l'addestramento dei cani, eseguito con le tecniche "gentili", come quello effettuato per i cani guida per ciechi, non comporta una situazione di disagio per l'animale. Inoltre si è evidenziato che l'addestramento è in grado di far esprimere all'animale doti di equilibrio che rimarrebbero altrimenti celate dagli aspetti più istintivi del carattere; ciò è apparso vero soprattutto per i

Golden Retriever, rivelatisi più timidi ed instabili emotivamente rispetto ai Labrador Retriever.

L'addestramento dunque, con il suo effetto equilibrante, rende l'animale più calmo dinnanzi a situazioni sconosciute, improvvise ed imprevedibili.

Un altro risultato interessante emerso dalla presente ricerca e che merita un ulteriore approfondimento è rappresentato dalle variazioni significative dei livelli fecali di cortisolo in relazione al sesso dell'addestratore e del non vedente.

Una maggiore attività fisica, invece, come quella prevista nell'esperimento 5, per la preparazione alle gare di Utilità e Difesa, determina un aumento delle concentrazioni fecali di cortisolo. Queste variazioni sono in relazione all'intensità del lavoro svolto, ma non alla sezione effettuata (pista, obbedienza o difesa). L'impegno agonistico prima di una competizione e il livello di addestramento raggiunto dai cani, influenzano le concentrazioni fecali di cortisolo a riposo e durante l'esercizio fisico.

# CONSIDERAZIONI FINALI

Nel presente studio è stato allestito e sono state valutate l'affidabilità e la praticità/utilità di un metodo non invasivo (determinazione del cortisolo nel pelo) per monitorare l'attività dell'asse HPA nei cani e nei gatti domestici. Successivamente, tale metodica è stata applicata per determinare quali condizioni ambientali e di vita di queste due specie possono interferire con il benessere degli stessi e quali miglioramenti si possono apportare per far sì che vengano rispettate le esigenze etologiche di specie.

I risultati hanno messo in luce che per entrambe le specie la disponibilità di spazio e di movimento siano critici infatti, per quanto riguarda i cani, si è visto che sia quelli dei canili che effettuavano lo sgambamento sia quelli di proprietà che vivevano in giardino presentavano livelli di cortisolo nel pelo inferiori rispetto a quelli che vivevano in spazi più ristretti; per quanto riguarda i gatti, invece, si è visto che i livelli di cortisolo nel pelo dei soggetti delle diverse oasi prese in considerazione diminuivano all'aumentare della disponibilità di spazio. Lo spazio disponibile, però, non è l'unico fattore da prendere in considerazione al fine di ottenere il benessere dell'animale infatti, in colonie che presentavano instabilità sociale e variabilità territoriale il cortisolo aveva valori elevati nonostante le notevoli disponibilità di spazio.

Anche un ambiente fisico e sociale "povero" e la carenza di contatto sociale e di interazioni con l'uomo possono influenzare il livello di benessere. A questo proposito, l'arricchimento ambientale fornito ai soggetti dello studio ha esercitato un'influenza positiva riducendo i livelli di cortisolo e migliorando, nei cani, la docilità, favorendone un'eventuale adozione, e riducendo, nei gatti, i comportamenti indicatori di stress.

Si è inoltre messo in luce che i programmi di addestramento, eseguiti con tecniche "gentili", non comportano situazioni stressanti per l'animale e aiutano i cani ad esprimere doti di equilibrio che rimarrebbero altrimenti celate dagli aspetti più istintivi del carattere. D'altra parte l'impegno agonistico prima di una competizione e il livello di addestramento raggiunto dai cani, influenzano le concentrazioni di cortisolo a riposo e durante l'esercizio fisico.

Pertanto, questi risultati possono sicuramente dare utili suggerimenti per la gestione e la cura di gatti e cani al fine di migliorarne le condizioni di benessere.

Il pelo, quindi, si è dimostrato un buon indicatore dell'attività dell'asse HPA. Tuttavia, rimangono alcune questioni da chiarire. In che modo, per esempio, l'asse HPA "cutaneo" è correlato ai livelli sistemici determinati dalla risposta surrenale? Le conoscenze scientifiche a riguardo sono scarse. Il follicolo pilifero è certamente un bersaglio per glucocorticoidi e androgeni, ma la vera localizzazione (sia intra che extra-cellulare) e la funzione di questi ormoni nel pelo sono ancora sconosciute (Stenn e Paus, 2001).

Alcuni studi hanno segnalato la presenza di entrambi gli ormoni steroidei o dei loro precursori (Botchkarev, 2003), dei loro recettori (Ahsan et al., 1998, Hoffmann, 2003; Oh e Smart, 1996; Sawaya e Price, 1997) e di enzimi coinvolti nel loro metabolismo (Hoffmann, 2003; Sawaya e Penneys, 1992; Sawaya e Price, 1997; Stenn e Paus, 2001) in diverse strutture o comparti epidermici del pelo (Bratka-Robia et al. , 2002), per di più la stessa unità pilosebacea è fonte di ormoni (compresi ACTH e cortisolo) come hanno dimostrato Ito *et al.*(2005) stimolando con CRH il follicolo pilifero umano (*in vitro*) e dimostrando una funzione equivalente a quella dell'asse HPA.

Inoltre è noto che c'è un nesso diretto tra il sistema nervoso e la pelle (Slominski e Wortsman, 2000), e, in particolare, tra il sistema nervoso e il follicolo pilifero, che è un bersaglio di mediatori, circolanti e locali, della risposta allo stress. Pertanto, si ritiene che la pelle operi come un equivalente dell'asse ipotalamico-pituitario-surrenalico locale che regola (*in vitro*), la sintesi e la secrezione di cortisolo e intervenga nel *feedback* negativo sulla regolazione dell'espressione del CRH (Botchkarev, 2003; Slominski et al. , 2007). Tutti questi studi hanno dimostrato che i follicoli piliferi hanno un sistema di risposta locale allo stress di natura endocrina, paracrina, autocrina e nervosa. Quindi, per tutti questi motivi i peli sembrano essere candidati ideali per la valutazione dello stress, ma l'unità pilosebacea è un sistema molto complesso. Questo rende la presenza di cortisolo nei peli di difficile interpretazione. Così, al momento attuale non siamo in grado di verificare se il cortisolo determinato nei peli sia di origine locale o sistemica o entrambi. Questa incertezza circa l'origine del cortisolo non invalida il significato dei nostri risultati, ma semplicemente suggerisce prudenza nella applicazione della metodica agli studi sullo stress cronico e stimola ad ulteriori indagini per chiarire questo argomento.

# BIBLIOGRAFIA

**ADAMS C., RINNIE R.W. (1982)** - *Stress protein formation: gene expression and environmental interaction with evolutionary significance*. "Int. Rev. Cytol.", 79, 305-315.

**AHSAN M.K., URANO Y., KATO S., OURA H., ARASE S. (1998)** - *Immunohistochemical localization of thyroid hormone nuclear receptors in human hair follicles and in vitro effect of L-triiodothyronine on cultured cells of hair follicles and skin*. "J. Med. Invest.", 44(3-4), 179-184.

**AKIL H., WATSON S.J., YOUNG E., LEWIS M.E., KHACHATURIAN H., WALKER M. (1984)** - *Endogenous opioids: biology and function*. "Annu. Rev. Neurosci.", 7, 223-255.

**ALTMANN J. (1974)** - *Observational study of behavior: sampling methods*. "Behaviour", 49, 227-267.

**ANAND K.J.S., SIPPELL W.G., AYNSLEY-GREEN A. (1987)** - *Randomised trial of Fentanyl anaesthesia in preterm babies undergoing surgery: effects on the stress response*. "Lancet", 1, 243-248.

**ANAND K.J.S., SIPPELL W.G., SCHOFIELD N.M., AYNSLEY-GREEN A. (1988)** - *Does halothane anaesthesia decrease the metabolic and endocrine stress responses of newborn infants undergoing operation*. "Br. Med. J.", 296, 668-677.

**APPLEBY M.C., HUGHES B.O. (1997)** - *Animal Welfare*. CAB International, Wallingford, UK.

**ARCHETTI I., RAVAROTTO L. (2002)** - *Esame emocromocitometrico e formula leucocitaria mediante strumento Cell-Dyn 3500®*, 77-83, in Amadori M., Archetti I., *La valutazione del benessere nella specie bovina*. Ed. Fondaz. Iniz. Zooprof. Zoot., Brescia.



**ARMARIO A., GARCIA-MARQUEZ C., JOLIN T. (1987)** - *Crowding-induced changes in basal and stress levels of thyrotropin and somatotropin in male rats.* "Behav. Neural Biol.", 48, 334-343.

**AXELROD J. (1984)** - *The relationship between the stress hormones, catecholamines, ACTH and glucocorticoids*, vol. 1, 3-13, in Usdin R., Kvetnansky and Axelrod J., *Stress: the role of catecholamines and other neurotransmitters*. Gordon and Breach, New York.

**BEERDA B., SCHILDER M.B.H., JANSEN N.S.C.R.M., MOL J.A. (1996)** - *The use of saliva cortisol, urinary cortisol and catecholamine measurements for a non-invasive assessment of stress responses in dogs.* "Horm. Behav.", 30, 272-279.

**BERK L.S., TAN S.A., FRY W.F., NAPIER B.J., LEE J.W., HUBBARD R.W., LEWIS J.E., EBY W.C. (1989)** - *Neuroendocrine and stress hormone changes during mirthful laughter.* "Am. J. Med. Sci.", 298, 390-396.

**BERTOLIN P., BORTOLUZZI M., RAVAROTTO L. (2002)** - *Analisi dei parametri chimico clinici impiegati quali indicatori di benessere animale*, 95-107, in Amadori M., Archetti I., *La valutazione del benessere nella specie bovina*. Ed. Fondaz. Iniz. Zooprof. Zoot., Brescia..

**BERTONI G. (2002)** - *Il benessere animale: sue motivazioni e criteri di valutazione.* Atti Soc. Agr. Lombardia, Bollettino dell'Agricoltura, 1 (III), 29-71.

**BIAGI G., NANNIPIERI S., SIGNORINI G. (2002)** - *Benessere in allevamento. le nuove norme sui suini.* "Annali della Facoltà di Medicina veterinaria", LV/2002, 41-58.

**BLOKHUIS H.J., JONES R.B., GEERS R., MIELE M., VEISSIER I. (2003)** - *Measuring and monitoring animal welfare: transparency in the food product quality chain.* "Anim. Welf.", 12, 445-455.

**BOTCHKAREV V.A. (2003)** - *Stress and the hair follicle: exploring the connections.* "Am. J. Pathol.", 162(3), 709-712.

**BOWERS L. D., SEGURA J. (1996)** - *Anabolic steroids, athlete drug testing, and the Olympic Games.* "Clin. Chem.", 42, 999-1000.

**BRADSHAW J.W.S. (1996)** - *Il comportamento del gatto*. 1 Ed., Edagricole, Bologna.

**BRAMBELL F.W.R. (1965)** - *Report of the Technical Committee to Enquire into Welfare of Animals kept under Intensive Livestock Husbandry System*. London: HMSO Command Report n.2836, 1-84.

**BRATKA-ROBIA C.B., EGERBACHER M., HELMREICH M., MITTEREGGER G., BENESCH M., BAMBERG E. (2002)** - *Immunohistochemical localization of androgen and oestrogen receptors in canine hair follicles*. "Vet. Derm.", 13(2), 113-118.

**BREAZILE J.E. (1988)** - *The physiology of stress and its relationship to mechanisms of disease and therapeutics*. "Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract.", 4, 441-480.

**BROOM D.M. (1986)** - *Indicators of poor welfare*. "Br. Vet. J." 142, 524-526.

**BROOM D.M. (1988)** - *The scientific assessment of animal welfare*. "Appl. Anim. Behav. Sci.", 20, 5-19.

**BROOM D.M. (1991)** - *Animal welfare: concepts and measurement*. "J. Anim. Sci.", 69, 4167-4175.

**BROOM D.M. (1996)** - *Animal welfare defined in terms of attempts to cope with the environment*. "Acta Agric. Scand. Sec. A. Anim. Sci. Suppl.", 27, 22-28.

**BROOM D.M. (1998)** - *Welfare, stress and the evolution of feelings*. "Adv. Study Behav.", 27, 371-403.

**BROOM D.M., JOHNSON K.G. (1993)** - *Stress and Animal Welfare*. 1st Ed., Chapman & Hall, London.

**BROOM D.M., JOHNSON K.G. (2000)** - *Stress and Animal Welfare*. Kluwer Academic Publishers.

**BRUGGEMAN V., VANMONTFORT D., RENAVILLE R., PORTETELLE D., DECUYPERE E. (1997)** - *The effect of food intake from two weeks of age to sexual maturity on plasma growth hormone, insulin-like growth factor-1, insulin-like growth*

*factor-binding proteins, and thyroid hormones in female broiler breeder chickens.* "Gen. Comp. Endocrinol.", 107, 212-220.

**BUCKINGHAM J.C., GILLIES G.E., COWELL A. (1999)** - *"Stress, stress hormones and the immune system"*. Wiley & Sons, Chichester.

**CALABRESE J.R., KLING M.A., GOLD P.W. (1987)** - *Alterations in immunocompetence during stress, bereavement and depression: focus on neuroendocrine regulation.* "Am. J. Psychiatry", 144, 1123-1134.

**CAMPBELL S. A., HUGHES H. C., GRIFFIN H.E., LANDI M. S., MALLON F. M. (1988)** - *Some effects of limited exercise on purpose-bred Beagles.* "Am. J. Vet. Res.", 49, 1298-1301.

**CARLSTEAD K., BROWN J.L., MONFORT S.L., KILLENS R., WILDT D.E. (1992)** - *Urinary monitoring of adrenal responses to psychological stressors in domestic and nondomestic felids.* "Zoo. Biol.", 11, 165-176.

**CARLSTEAD K., BROWN J.L., STRAWN W. (1993)** - *Behavioral and physiological correlates of stress in laboratory cats.* "Appl. Anim. Behav. Sci.", 38, 143-158.

**CARROLL J.A., VEUM T.L., MATTERI R.L. (1998)** - *Endocrine responses to weaning and changes in post-weaning diet in the young pig.* "Domest. Anim. Endocrinol.", 15, 183-194.

**CATALDI M., MAGNAN E., GUILLAUME V., DUTOIR A., SAUZE N., MAZZOCCHI L., CONTE-DEVOLX B., OLIVER C. (1994)** - *Acute stress stimulated secretion of GHRH and somatostatin into hypophysial portal blood of conscious sheep.* "Neurosci. Lett.", 178, 103-106.

**CIRIMELE V., KINTZ P., DUMESTRE V., GOULLE J. P., LUDES B. (2000)** - *Identification of ten corticosteroids in human hair by liquid chromatography-ionspray mass spectrometry.* "Forensic Sci. Int.", 107, 381-388.

**CLAPPERTON B.K., EASON C.T., MORGAN D.R. (1994)** - *Development and testing of attractants for feral cats, Felis catus L.* "Wildl. Res.", 21 (4), 389-399.

**COOK C.J., MELLOR D. J., HARRIS P.J., INGRAM J.R., MATTHEWS L.R. (2000)** - *Hands-on and hands-off measurement of stress*, 123-146, in Moberg G.P., Mench, J.A., *Biology of Animal Stress*, CABI Publishing.

**COOPER T.R., TRUNKFIELD H.R., ZANELLA A.J., BOOTH W.D. (1989)** - *An enzyme-linked immunosorbent assay for cortisol in the saliva of man and domestic farm animals*. "Endocr. J.", 123, 13-16.

**DAVENPORT M.D., TIEFENBACHER S., LUTZ C.K., NOVAK M.A., MEYER J.S. (2006)** - *Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques*. "Gen. Comp. Endocrinol.", 147, 255-261.

**DE PALMA C., VIGGIANO E., BARILLARI E., PALME R., DUFOUR A.B., FANTINI C., NATOLI E. (2005)** - *Evaluating the temperament in shelter dogs*. "Behaviour", 142, 1307-1328.

**DESS N.K., LINWICK D., PATTERSON J., OVERMIER J.B. (1983)** - *Immediate and proactive effects of controllability and predictability on plasma cortisol responses to shocks in dogs*. "Behav. Neurosci.", 97 (6), 1005-1016.

**DUNCAN I.J.H., WOOD-GUSH D.G.M. (1971)** - *Frustration and aggression in the domestic fowl*. "Anim. Behav.", 19, 500-504.

**DWYER C.M., BORNETT-GAUCI H.L.I. (2004)** - *Chronic stress in sheep: assessment tools and their use in different management conditions*. "Anim. Welf.", 13, 293-304.

**FARMER C., DUBREUIL P., COUTURE Y., BRAZEAU P., PETITCLERC D. (1991)** - *Hormonal changes following an acute stress in control and somatostatin-immunized pigs*. "Domest. Anim. Endocrinol.", 8, 527-536.

**FELL L.R., SHUTT D.A. (1986)** - *Use of salivary cortisol as an indicator of stress due to management practices in sheep and calves*. "Proc. Aust. Anim. Prod.", 16, 203-206.

**FELL L.R., SHUTT D.A., BENTLEY C.J. (1985)** - *Development of a salivary cortisol method for detecting changes in plasma "free" cortisol arising from acute stress in sheep*. "Aust. Vet. J.", 62, 403-406.

**FOGLE B., (2000)** - *La mente dell'anziano e del malato*, 258-263, in Fogle B., *La mente del cane*, Geo, Milano.

**FRASER D. (1975)** - *The effect of straw on the behavior of sows in tether stalls*. "Anim. Prod.", 21, 59-68.

**FRASER, A.F., BROOM, D.M. (1990)** - *Farm Animal Behaviour and Welfare*. Baillière Tindall, London.

**GABRIELSEN, G.W. KANNWISHER, J.W., STEEN, J.B. (1977)** - *Emotional bradycardia: a telemetric study on incubation willow grouse *Lagopus lagopus**. "Acta Physiol. Scand.", 100, 255-257.

**GAILLARD, R.C., AL-DAMLUJI S. (1987)** - *Stress and the pituitary-adrenal axis*. "Baillière's Clin. Endocrinol. Metab.", 1, 319-354.

**GARTNER K., BUTTNER D., DOHLER K., FRIEDEL R., LINDEN J., TRAUTSCHOLD L. (1980)** - *Stress response of rats to handling and experimental procedures*. "Lab. Anim.", 14, 267-274.

**GERRA G., ZAIMOVIC A., GIUCASTRO G., FOLLI F., MAESTRI D., TESSONI A., AVANZINI P., CACCAVARI R., BERNASCONI S., BRAMBILLA F. (1998)** - *Neurotransmitter-hormonal responses to psychological stress in peripubertal subjects: relationship to aggressive behavior*. "Domest Anim. Endocrinol." 62, 617-625.

**GIBBS D.M. (1986)** - *Vasopressin and oxytocin: hypothalamic modulators of the stress response: a review*. "Psychoneuroendocrinology", 11, 131-140.

**GLEIXNER A., MEYER H. H. D. (1997)** - *Detection of estradiol and testosterone in hair of cattle by HPLC/EIA*. "Fresenius J. Anal. Chem.", 357, 1198-1201.

**GOYA R.G., SOSA Y.E., CONSOLE G.M., DARDENNE M. (1995)** - *Altered thyrotropic and somatotropic responses to environmental challenges in congenitally athymic mice*. "Brain Behav. Immun.", 9, 79-86.

**GOOSENS M.M.C., MEYER H.P., VOORHOUT G., SPRANG E.P.M. (1995)** - *Urinary excretion of glucocorticoids in the diagnosis of hyperadrenocorticism in cats*. "Domest. Anim. Endocrinol.", 12, 355-362.

**GRIFFIN J.F.T. (1989)** - *Stress and immunity: a unifying concept*. "Vet. Immunol. Immunopathol.", 20, 263-312.

**GROSSMAN A. (1988)** - *Opioids and stress in man*. "J. Endocrinol.", 119, 377-381.

**GUYTON A.C. (1991)** - *Textbook of Medical Physiology*. 8th Ed., W.B. Saunders, Philadelphia.

**HARRISON R. (1964)** - *Animal Machines*. Vincent Stuart Publishers, London.

**HAY M., MEUNIER-SALAUN M.C., BRULAUD F., MONNIER M., MORMEDE P. (2000)** - *Assessment of hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sympathetic nervous system activity in pregnant sows through the measurement of glucocorticoids and catecholamines in urine.* "J. Anim. Sci.", 78, 420-428.

**HENNESSY M.B., DAVIS H.N., WILLIAMS M.T., MELLAT C., DOUGLAS C.W. (1997)** - *Plasma cortisol levels of dogs at a county animal shelter*. "Physiol. Behav.", 62 (3), 485-490.

**HETTS S. (1991)** - *Psychologic well-being: Conceptual issues, behavioural measures and implications for dog*. "Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.", 21, 369-387.

**HOFFMANN R. (2003)** - *Steroidogenic isoenzymes in human hair and their potential role in androgenetic alopecia*. "Dermatology", 206(2): 85-95.

**HOLD K. M., BORGES C. R., WILKINS D. G., ROLLINS D. E., JOSEPH R. E. JR. (1999)** - *Detection of nandrolone, testosterone, and their esters in rat and human hair samples*. "J. Anal. Toxicol.", 23, 416-423.

**HOLLY J.M., WASS J.A. (1989)** - *Insulin-like growth factors; autocrine, paracrine or endocrine? New perspectives of the somatomedin hypothesis in light of recent developments*. "J. Endocrinol." 122, 611-618.

**HUGHES H. C., CAMPBELL S., KENNEY C., (1989)** - *The effects of cage size and pair housing on exercise of Beagle dogs*. "Lab. Anim. Sci.", 39, 302-305.

**HUGHES B.O., DUNCAN I.J.H. (1988)** - *Behavioural needs: can they be explained in terms of motivational models?* "Appl. Anim. Behav. Sci.", 20, 352-355.

**HURNIK J.F. (1987)** - *Sexual behavior of female domestic mammals.* "Vet. Clin. North Am: Food Anim. Pract", 3, 423-461.

**ITO N., ITO T., KROMMINGA A., BETTERMANN A., TAKIGAWA M., KEES F., STRAUB R.H., PAUS R. (2005).** *Human hair follicles display a functional equivalent of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and synthesize cortisol.* "The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology", 19(10), 1332-1334.

**JANEWAY C.A. (1989)** - *A primitive immune system.* "Nature", 341, 108.

**JURCOVICOVA J., KVETNANSKY R., DOBRAVOVA M., JEZOVA D., KISS A., MAKARA G.B. (1990)** - *Prolactin response to immobilization stress and hemorrhage: the effect of hypothalamic differentiations and posterior pituitary denervation.* "Endocrinology", 126, 2527-2533.

**JUSZCZAK M. (1998)** - *Melatonin affects the oxytocin and prolactin responses to stress in male rats.* "J. Physiol. Pharmacol", 49, 151-163.

**KAKIZAWA S., KANEKO T., HASEGAWA S., HIRANO T. (1995)** - *Effects of feeding, fasting, background adaptation, acute stress, and exhaustive exercise on the plasma somatolactin concentrations in rainbow trout.* "Gen. Comp. Endocrinol." 98, 137-146.

**KAPLAN A.J., PETERSON M.E., KEMPPAINER, R. J. (1995)** - *Effects of disease on results of diagnostic tests for use in detecting hyperadrenocorticism in dogs.* "J. Am. Vet. Assoc.", 207, 445-451.

**KELLEY K.W. (1985)** - *Immunological consequences of changing environmental stimuli*, 193-223, in Kelley K.W., *Anim. Stress*. Americ. Physiol. Assoc., Bethesda, Ed. G.P.Moberg, Maryland.

**KEMPPAINEN R.J., SARTIN J.L. (1987)** - *Differential regulation of peptide release by the canine pars distalis and pars intermedia.* "Front. Horm. Res.", 17, 18-27.

**KESSLER M.R., TURNER D.C. (1999)** - *Socialization and stress in cats (Felis silvestris catus) housed singly and in groups in animal shelters*. "Anim. Welf.", 8 (1), 15-26.

**KETELSLEGERS J.M., MAITER D., MAES M., UNDERWOOD L.E., THISSEN J.P. (1995)** - *Nutritional regulation of insulin-like growth factors*. "Metab. Clin. Exp.", 44, 50-57.

**KINTZ P., CIRIMELE V., JEANNEAU T., LUDES B. (1999)** - *Identification of testosterone and testosterone esters in human hair*. "J. Anal. Toxicol." 23, 352–356.

**KIRSCHBAUM C., PIRKE K. M., HELLHAMMER D. H. (1993)** - *The 'Tries Social Stress Test' – a tool for investigating psychobiological stress responses in a laboratory setting*. "Neuropsychobiology", 28, 76- 81.

**KLEMCKE H.G., NEINABER J.A., HAHN G.L. (1987)** - *Stressor-associated alteration in porcine plasma prolactin*. "Proceed. Soc. Experim. Biol. Med.", 186, 333-343.

**KNOL B.W., DIELEMAN S.J., BEVERS M.M., VAN DEN BROM W.E., MOLT J.A. (1992)** - *Effects of methods used for blood collection on plasma concentrations of luteinising hormone, testosterone and cortisol in male dogs*. "Vet Q.", 14, 126–129.

**KOBELT A.J., HEMSWORTH P.H., BARNET J.L., BUTLER K.L. (2003)** - *Sources of sampling variation in saliva cortisol in dogs*. "Res.Vet. Sci.", 75, 157-171.

**KOREN L., MOKADY O., KARASKOVT T., KLENT J., KOREN G., GEFFEN E. (2002)** - *A novel method using hair for determining hormonal levels in wildlife*. "Anim. Behav.", 63, 403-406.

**KRULICH L., HEFCO E., ILLER P., READ C.B. (1974)** –*The effects of acute stress on the secretion of LH, FSH, prolactin and growth hormone in the normal male rat, with comments on their statistical evaluation*. "Neuroendocrinology", 16, 293-311.

**LEHNER P.N. (1979)** - *Handbook of ethological methods*. Garland STPM Press, New York & London.



**LEPPALUOTO J., KORHONEN I., HUTTUNEN P., HASSI J. (1988)** – *Serum levels of thyroid and adrenal hormones, testosterone, TSH, LH, GH and prolactin in men after 2-h stay in a cold room.* “Acta Physiol. Scand.”, 132, 543-548.

**LEYHAUSEN P. (1979)** - *Cat behaviour: the predatory and social behaviour of domestic and wild cat.* Garland STPM Press, New York & London.

**LIBERG O., SANDELL M. (1988)** - *Spatial organisation and reproductive tactics in the domestic cat and other felids*, 83-98, in Turner D.C., Bateson P.P.G., *The domestic cat, the biology of its behaviour.* Cambridge University Press, Cambridge. Ed. 2000.

**LIBERG O., SANDELL M., PONTIERI D., NATOLI E. (2000)** - *Density, spatial organization and reproductive tactics in the domestic cat and other felids*, 119-147, in Turner D.C., Bateson P.P.G., *The domestic cat. The biology of its behaviour.* Cambridge University Press, Cambridge, Ed. 2<sup>nd</sup>.

**LINDSAY D.R. (1985)** - *Reproductive anomalies*, 413-418, in Fraser A.F., *Ethology of farm animals. A Comprehensive Study of the Behavioural Features of the Common Farm Animals.* Elsevier, Amsterdam.

**LIU X., CHEN F., GUO D., SONG X., ZHONG Y. (1988)** - *Early pregnancy diagnosis in dairy cows based on hair progesterone analysis.* “Int. J. Anim. Sci.”, 3, 123–127.

**LORZ A. (1973)** - *Tierschutzgesetz – Kommentar.* Verlag Beck, München.

**MA L., BURTON K.A., SAUNDERS J.C., DAUNCEY M.J. (1992)** - *Thermal and nutritional influences on tissue levels of insulin-like growth factor-1 mRNA and peptide.* “J. Therm. Biol.”, 17, 89-95.

**MARIANI A.P., PREZIUSO F., MARIANI A., RAVA M., DELLE ROSE D. (1997)** - *Il cane “atleta”: alcuni parametri enzimatici e non enzimatici nell’impegno muscolare.* Annali Facoltà Medicina Veterinaria, Pisa, 50, 251-274.

**MARTI O., GAVALDA A., JOLIN T., ARMARIO A. (1996)** - *Acute stress attenuates but does not abolish circadian rhythmicity of serum thyrotropin and growth hormone in the rat.* “Eur. J. Endocrinol.”, 135, 703-708.

**MARTIN P., BATESON P. (1986)** - *Measuring behaviour*. Cambridge University Press, Cambridge.

**MATTERI, R.L. (1994)** - *Anterior pituitary hormones*, 370-380, vol.13, in Kirk Othmer, *Encyclopedia of Chemical Technology*. Wiley & Sons, New York.

**MATTERI R.L., CARROLL J.A., DYER C.J. (2000)** - *Neuroendocrine Responses to Stress*, 43-76, in Moberg G.P. and Mench J.A., *The biology of animal stress*. CABI Publishing.

**MATTHEWS S.G., PARROT R.F. (1994)** - *Centrally administered vasopressin modifies stress hormone (cortisol, prolactin) secretion in sheep under basal conditions, during restraint and following intravenous corticotrophin-releasing hormone*. "Eur. J. Endocrinol.", 130, 297-301.

**MAUREL D., COUTANT C., BOISSIN-AGASSE L., BOISSIN J. (1986)** - *Seasonal molting pattern in three fur bearing mammals: the European badger (*Meles meles*), the red fox (*Vulpes vulpes*) and the mink (*Mustela vison*): a morphological and histological study*. "Can. J. Zool.", 64, 1757-1764.

**McCUSKER R.H. (1998)** - *Controlling insulin-like growth factor activity and the modulation of insulin-like growth factor binding protein and receptor binding*. "J. Dairy Sci.", 81, 1790-1800.

**McELVAIN S.M., BRIGHT R.D., JOHNSON P.R. (1941)** - *The Constituents of the volatile oil of catnip. I. Nepetalic Acid, Nepetalactone and related compounds*. "J. Amer. Chem. Soc.", 63, 1558-1563.

**MELLOR D.J., MURRAY L. (1989)** - *Effects of tail docking and castration on behavior and plasma cortisol concentrations in young lamb*. "Res. Vet. Sci.", 44, 119-137.

**MEYER-HOLZAPFEL M. (1968)** - *Abnormal behavior in zoo animals*, 476-503, in Fox M.W., *Abnormal behavior in animals*. Saunders W.B., Philadelphia.

**MILLSPAUGH J.J., WASHBURN B.E. (2004)** - *Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation*. "Gen. Comp. Endocrinol.", 138 (3), 189-199.

**MOBERG G. P. (1985)** - *Biological response to stress: key to assessment of animal well-being?*, 27-49, in Moberg, G. P, *Animal stress*. American Physiological Society, Bethesda, Maryland.

**MOBERG G.P. (1991)** - *How behavioral stress distrupts the endocrine controlof reproductionindomestic animals*. "J. Dairy Sci.", 74, 304-311.

**MOBERG G.P. (2000)** - *Biological response to stress: implications for animal welfare*, 1-21, in Moberg G.P. e Mench J.A, *The Biology of Animal Stress*. CABI Publishing.

**MONDELLI F., MONTANARI S., PRATO PREVIDE E., VALSECCHI P. (2003)** - *Temperament evaluation of dog housed in an italian rescue shelter as a tool to increase the adoption success*. "Anim. Welf.", 13, 251.

**MORIN P. A., WALLIS J., MOORE J. J., WOODRUFF D. S. (1994)** - *Paternity exclusion in a community of wild chimpanzees using hypervariable simple sequence repeats*. "Mol. Ecol.", 3, 469-478.

**MOSTL E., PALME R. (2002)** - *Hormones as indicators of stress*. "Domest. Anim. Endocrinol.", 23, 67-74.

**MOTTA M., DEGLI ESPOSTI A. (1981)** - *A computer program for mathematical treatment of data in radioimmunoassay*. "Comput. Programs Biomed.", 13, 121-129.

**NEWBERRY R. C. (1995)** - *Environmental enrichment: increasing the biological relevance of captive environments*. "Appl. Anim. Behav. Sci.", 44, 229-243.

**NORMANDO S., STEFANINI C., MEERS L., ADAMELLI S., COULTIS D., BONO G. (2006)** - *Some factors influencing adoption of sheltered dogs*. "Anthrozoos", 19 (3), 211-224.

**NOVAK M.A., DREWSSEN K.H. (1989)** - *Enriching the lives of captive primates*, 162-164, in Segal E.F., *Housing, Care and Psychological Wellbeing of captive and laboratory Primates*. Noyes Publications, Park Ridge, New Jersey,.

**OH H.S., SMART R.C. (1996)** - *An estrogen receptor pathway regulates the telogen-anagen hair follicle transition and influences epidermal cell proliferation.* "P.N.A.S. USA", 93(22), 12525-12530.

**OSELLA M. C., PANICHI M., BERGAMASCO L. (2005)** - *Il benessere nei canili rifugio: problematiche etologiche, medico-legali e soluzioni.* Supplemento (dicembre 2005) a Veterinaria, Anno 19, n. 4, Agosto 2005, 51-58.

**OZAWA A., JOHKE T., HODATE K. (1994)** - *Plasma insulin-like growth factor – 1 response to cold exposure in barrows.* "J. Endocrinol.", 41, 725-730.

**POPPER C.W., CHIUEH C.C., KOPIN I.J. (1977)** - *Plasma catecholamine concentrations in unanesthetized rats during sleep, wakefulness, immobilization and after decapitation.* "J. Pharmacol. Exp. Ther.", 202, 144-148.

**PREZIUSO F., PREZIUSO S. (2001)** - *Lattato e cortisolo nell'esercizio muscolare e nell'allenamento sportivo. Valutazione specifica e rapporti nel Segugio, nel Setter Inglese, nello Spinone, nel Pastore Tedesco e nel Levriero.* Annali Facoltà Medicina Veterinaria, Pisa, 54, 349-360.

**PRZKOP F., STUPNICKA E., WOLINSKA - WITORT E., MATEUSIAK K., SADOWSI B., DOMANSKI E. (1985)** - *Changes in circadian rhythm and suppression of the plasma corticoid level after prolonged stress in the sheep.* "Acta Endocrinol.", 110, 540-545.

**RADOSEVICH P.M., NASH J.A., LACY D.B., O'DONOVAN C., WILLIAMS P.E., ABRUMRAD N.N. (1989)** - *Effects of low- and high-intensity exercise on plasma and cerebrospinal fluid levels of ir-beta-endorphin, ACTH, cortisol, norepinephrine and glucose in the conscious dog.* "Brain Res.", 498(1), 89-98.

**RICHTER S.D., SCURMEYER T.H., SCHEDLOWSKI M., HADICKE A., TEWES U., SCHMIDT R.E., WAGNER T.O. (1996)** - *Time kinetics of the endocrine response to acute psychological stress.* "J. Clin. Endocrinol. Metab.", 81, 1956-1960.

**RIEGLE G.D., MEITES J. (1976)** - *The effect of stress on serum prolactin in the female rat.* "Proc. Soc. Exp. Biol. Med.", 152, 441-448.

**RIJNBERK A., MOL J.A. (1989)** - *Adrenocortical function*, 610-629, in Kaneko J. J., *Clinical Biochemistry of domestic animals*. IV ed., San Diego, Academic Press.

**RIVIER C., RIVEST S. (1991)** - *Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms*. "Biol. Reprod.", 45, 523-532.

**RIVEST S., RIVIER C. (1995)** - *The role of corticotropin-releasing factor and interleukin-1 in the regulation of neurons controlling reproductive function*. "Endocr. Rev.", 16, 177-199.

**ROTHUIZEN R., REUL J.M.H.M., VAN SLUIJS F.J., MOL J.A., RIJNBERK A., DE KLOET E.R. (1993)** - *Increased neuroendocrine reactivity and decreased brain mineralcorticoid receptor-binding capacity in aged dogs*. "Endocrinology", 132, 161-168.

**RUSHEN J. (1993)** - *The "copying" hypothesis of stereotypic behaviour*. "Anim. Behav.", 45, 613-615.

**RUSHEN J., SCHWARZE N., LADEWING J., FOXCROFT G. (1993)** - *Opioid modulation of the effects of repeated stress on ACTH, cortisol, prolactin, and growth hormone in pigs*. "Physiol. Behav.", 53, 923-928.

**SAKAMOTO K., WAKABAYASHI I., YOSHIMOTO S., MASUI H., KATSUNO S. (1991)** - *Effects of physical exercise and cold stimulation on serum testosterone level in man*. "Japanese J. Hygiene", 46, 635-638.

**SAKAN T., ISOE S., HYEON S.B., KATSMURA R., WOLINSKY J., DICKERSON D., SLABAUGH M., NELSON D. (1965)** - *The exact nature of Matatabilactone and the terpens of Nepeta cataria*. "Tetrahedron Lett.", 46, 4097-4102.

**SAKURAI K., IKEDO K., MORI K. (1988)** - *Both (4aS,7S,7aR)-(+) - Nepetalactone and its antipode are powerful attractants for cats*. "Agric. Biol. Chem.", 52, 2369-2371.

**SALMON P. W., SALMON I. M. (1983)** - *Who owns who? Psychological research into the human-pet bond in Australia*, 244-265, in Katcher A. H., Beck A. M.,

*New Prospectives on Our Lives with Companion Animals*. University of Pennsylvania Press, Philadelphia.

**SAWAYA M.E., PENNEYS N.S. (1992)** - *Immunohistochemical distribution of aromatase and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in human hair follicle and sebaceous gland*. "J. Cutan. Pathol.", 19(4), 309-314.

**SAWAYA M.E., PRICE V.H. (1997)** - *Different levels of 5 $\alpha$ -reductase type I and II, aromatase, and androgen receptor in hair follicles of women and men with androgenetic alopecia*. "J. Invest. Derm.", 109(3), 296-300.

**SCHATZ S., PALME R. (2001)** - *Measurement of faecal cortisol metabolites in cats and dogs: a non invasive method for evaluating adrenocortical function*. "Vet. Res. Commun.", 24, 271-287.

**SEGGIE J.A., BROWN G.M. (1975)** - *Stress response patterns of plasma corticosterone, prolactin, and growth hormone in the rat, following handling or exposure to novel environment*. "Can. J. Physiol. Pharmacol.", 53, 629-637.

**SELYE H. (1936)** - *A syndrome produced by diverse nocuous agents*. "Nature", 138, 32-34.

**SELYE H. (1939)** - *The effect of adaptation to various damaging agents in the female sex organs in the rat*. "Endocrinology", 25, 615-624.

**SELYE H. (1946)** - *The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation*. "J. Clin. Endocrinol.", 6, 117-230.

**SHEPHERDSON D. J., MELLEN J. D., HUTCHINS M. (1998)** - *Second Nature: Environmental Enrichment for Captive Animals*. Smithsonian Institution Press, London.

**SIEGEL R.A., WEIDENFELD J., FELDMAN S., CONFORTI N., CHOWERS I. (1981)** - *Neural pathways mediating basal and stress-induced secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and testosterone in the rat*. "Endocrinology", 108, 2302-2307.

**SILVER I.A. (1982)** - *The firing of Horses*. Final report to the Veterinary Advisory Committee of the Horse Race Betting Levy Board (1982), 48.

**SLOMINSKI A., WORTSMAN J. (2000)** - *Neuroendocrinology of the skin*. "Endocr. Rev.", 21(5), 457-487.

**SLOMINSKI A., WORTSMAN J., TUCKEY R.C., PAUS R. (2007)** – *Differential expression of HPA axis homolog in the skin*. "Mol. Cell. Endocrinol.", 265-266, 143-149.

**SMELIK P.G. (1987)** - *Adaptation and brain function*. "Prog. Brain. Res.", 72, 3-9.

**STEIN M., KELLER S.E., SCHLEIFER S.J. (1985)** - *Stress and immunomodulation: the role of depression and neuroendocrine function*. "J. Immunol.", 135, 827S-833S.

**STENN K.S., PAUS R. (2001)** - *Controls of hair follicle cycling*. "Physiol. Rev.", 81(1), 449-494.

**STRATAKIS C.A., CHROUSOS G.P. (1995)** - *Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system*. Annals of the New York Academy of Science, 771, 1-18.

**STRAUS D.S. (1994)** - *Nutritional regulation of hormones and growth factors that control mammalian growth*. Federation of American Societies for "Exp. Biol. J.", 8, 6-12.

**SYME L.H., ELPHICK G.R. (1982)** - *Heart-rate and the behaviour of sheep in yards*. "Appl. Anim. Ethol.", 9, 31-35.

**TAMANINI C., GIORDANO N., CHIESA F., SEREN E. (1983)** - *Plasma cortisol variations induced in the stallion by mating*. "Acta Endocrinol.", 102, 447-450.

**TERLOUW E.M.C., SCHOUTEN W.G.P., LADEWIG J. (1997)** – *Physiology*, 143-158, in Appleby M.C., Hughes B.O., *Animal Welfare*. CAB International, Cambridge.

**THEORELL T. (1998)** - *Prolactin – a hormone that mirrors passiveness in crisis situations*. "Integr. Physiol. Behav. Sci.", 27, 32-38.

**TODD N.B. (1962)** - *Inheritance of the catnip response in domestic cats*. "J. Hered.", 53, 54-56.

**TROISI A. (2002)** - *Displacement activities as a behavioural measures of stress in non-human primates and human subject*. "Stress", 5, 47-54.

**TUBER D. S., MILLER D.D., CARIS K. A., HALTER R., LINDEN F., HENNESSY M.B. (1999)** - *Dogs in animal shelter: problems, suggestions and needed expertise*. "Psychol. Sci.", 10, 379-386.

**TUCKER A.O., TUCKER S.S. (1988)** - *Catnip and the catnip response*. "Econ. Bot.", 42, 214-231.

**TURPEN C., JOHNSON D.C., DUNN J.D. (1976)** - *Stress-induced gonadotrophin and prolactin secretory pattern*. "Neuroendocrinology", 20, 339-351.

**UK CAT BEHAVIOUR WORKING GROUP (BRADSHAW J.W.S., BROWN S.L., COOK S.E., DURMAN K.J., SMITH D.F.E. et 7 al.) (1995)** - *An ethogram for behavioural studies of the domestic cat (Felis silvestris catus L.)*. "UFAW Animal Welfare Research Report", 8, Universities Federation for Animal Welfare, Potters Bar, UK. (18pp+23 plates).

**VALSECCHI P., MONDELLI F., PRATO PREVIDE E. (2001)** - *A study of dogs behavior in a rescue shelter: description of their temperament and definition of rehoming criteria*. 9th International Conference on Human-Animal Interactions, Rio de Janeiro, Brazil.

**VANCE M.L., HARTMAN M.L., THORNER M.O. (1992)** - *Growth hormone and nutrition*. "Horm. Res.", 38, 85-88.

**VAN DEN BERGHE G., DE ZEGHER F. (1996)** - *Anterior pituitary function during critical illness and dopamine treatment*. "Crit. Care Med.", 24, 1580-1590.

**VAN PUTTEN G. (1973)** - *Enkele aspecten van het gedrag van varkens*. Proceedings Varkensstudiedag, 10 mei 1973 te Gent, België. Wessanen, Wormerveer, 43-46.

**VAN PUTTEN G. (1980)** - *Objective observations on the behavior of fattening pigs*. "Anim. Regul. Stud.", 3, 105-118.



**VERKERK G. A., PHIPPS A.M., CARRAGHER J.F., MATTHEWS L.R., STELWAGEN K. (1998)** - *Characterisation of milk cortisol concentrations as a measure of short-term stress responses in lactating dairy cows.* "Anim. Welf.", 7, 77-86.

**VILLARES S.M.F., GOUJON L., MANIAR S., DELEHAYE-ZERVAS M.C., MARTINI J.F., KLEINKNECHT C., POSTEL-VINAY M.C. (1994)** - *Reduced food intake is the main cause of low growth hormone receptor expression in uremic rats.* "Mol. Cell. Endocrinol.", 106, 51-56.

**WEEKE J., GUNDERSON H. J. (1983)** - *The effect of heating and central cooling on serum TSH, GH, and norepinephrine in resting normal men.* "Acta Physiol Scand.", 117, 33-39.

**WEISSMAN C. (1990)** - *The metabolic response to stress: an overview and update.* "Anesthesiology", 73, 308-327.

**WELLS D. L., GRAHAM L., HEPPER P. G. (2002)** - *The influence of auditory stimulation on the behavior of dogs housed in a rescue shelter.* "Anim. Welf.", 11, 385-393.

**WELLS D. L., HEPPER P. G., (2000)** - *The influence of environmental change on the behaviour of sheltered dogs.* "Appl. Anim. Behav. Sci.", 68, 151-162.

**WENK C. (1998)** - *Environmental effects on nutrient and energy metabolism in pigs.* "Archiv fur Tierernahrung", 51, 211-224.

**WIEPKEMA P.R., BROOM D.M., DUNCAN I.J.H., VAN PUTTEN G. (1983)** - *Abnormal Behaviours in Farm Animals.* Commission of the European Communities, Bruxells.

**WIEPKEMA P.R., KOOLHAAS J.M. (1993)** - *Stress and animal welfare.* "Anim. Welf.", 2, 195-218.

**WILLEMSE T., VROOM M.W., MOL J.A., RIJNBERK A. (1993)** - *Changes in plasma cortisol, corticotropin, and alpha-melanocyte-stimulating hormone concentrations in cats before and after physical restraint and intradermal testing.* "Am. J. Vet. Res.", 54, 69-72.

**WOODRUFF D. S. (1993)** - *Non-invasive genotyping of primates*. "Primates", 34, 337–351.

**YANG H.Z., LAN J., MENG Y.J., WAN X.J., HAN D.W. (1998)** - *A preliminary study of steroid reproductive hormones in human hair*. "J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.", 67, 447-450.

**YOUNG K.M., WALKER S.L., LANTHIER C., WADDELL W.T., MONFORT S.L., BROWN J.L., (2004)** - *Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses*. "Gen. Comp. Endocrinol.", 137, 148–165.

#### SITI INTERNET CONSULTATI

[www.civ-viande.org/it/ebn.ebn?pid=57&rubrik=1&item=6&page=7](http://www.civ-viande.org/it/ebn.ebn?pid=57&rubrik=1&item=6&page=7), consultato il 07/06/2007.

[www.fawc.org.uk](http://www.fawc.org.uk), consultato il 12/02/2008.

[www.mclink.it/assoc/lida/carta.htm](http://www.mclink.it/assoc/lida/carta.htm), consultato il 15/12/2007.

[www.ministerosalute.it](http://www.ministerosalute.it), consultato il 12/01/2008.

[www.sinab.it/programmi/webcreate.php?id=749](http://www.sinab.it/programmi/webcreate.php?id=749), consultato il 17/01/2008.

#### RIFERIMENTI LEGISLATIVI

Legge 14 ottobre 1985 n. 623 – Legge di ratifica della Convenzione europea sulla protezione degli animali negli allevamenti adottata a Strasburgo il 10 marzo 1976. Pubblicato su: *Fonte CED Corte di Cassazione urn:nir:stato:legge:1985-10-14;623*.

Legge 281 del 14 Agosto 1991. Legge quadro in materia di animali di affezione e prevenzione del randagismo. *GU n. 203 del 30 Agosto 1991*.

Direttiva 91/629/CEE del Consiglio del 19 Novembre 1991 che stabilisce le norme minime per la protezione dei vitelli. *GUCE L 340 dell'11 Dicembre 1991*.

Direttiva 91/630/CEE del Consiglio del 19 Novembre 1991 che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini. *GUCE L 340 dell'11 Dicembre 1991*.

Decreto Legislativo 27 Gennaio 1992 n. 116. Attuazione della Direttiva n. 86/609/CEE in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici. *GU n. 40 del 18 Febbraio 1992, Suppl. Ordinario n. 33.*

Decreto Legislativo 30 Dicembre 1992 n. 533. Attuazione della Direttiva 91/629/CEE che stabilisce le norme minime per la protezione dei vitelli. *GU n. 7 dell'11 Gennaio 1993, Suppl. Ordinario n.5.*

Decreto Legislativo 30 Dicembre 1992 n. 534. Attuazione della Direttiva 91/630/CEE che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini. *GU n. 7 dell'11 Gennaio 1993, Suppl. Ordinario n.5.*

Direttiva 97/2/CE del Consiglio del 20 Gennaio 1997 recante modifica della Direttiva 91/629/CEE che stabilisce le norme minime per la protezione dei vitelli. *GUCE L 025 del 28 Gennaio 1997.*

Decreto legislativo 1° Settembre 1998 n. 331. Attuazione della Direttiva 97/2/CE relativa alle norme minime per la protezione dei vitelli. *GU n. 224 del 25 Settembre 1998. Rettifica GU n. 181 del 4 Agosto 1999.*

Direttiva 98/58/CE del Consiglio del 20 Luglio 1998 riguardante la protezione degli animali negli allevamenti. *GUCE L 221 del' 8 Agosto 1998.*

Direttiva 1999/74/CE del Consiglio del 19 Luglio 1999 che stabilisce le norme minime per la protezione delle galline ovaiole. *GU L 203 del 3 Agosto 1999.*

Decreto Legislativo 26 Marzo 2001 n. 146. Attuazione della Direttiva 98/58/CE relativa alla protezione degli animali negli allevamenti. *GU n. 95 del 24 Aprile 2001.*

Direttiva 2001/88/CE del Consiglio del 23 ottobre 2001 recante modifica della direttiva 91/630/CEE che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini. *GU L 316 dell'1 Dicembre 2001.*

Direttiva 2001/93/CEE della Commissione del 9 Novembre 2001 recante modifica della Direttiva 91/630/CE che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini. *GUCE L 316 dell'1 Dicembre 2001.*

Direttiva 2002/4/CE della Commissione del 30 Gennaio 2002 relativa alla registrazione degli stabilimenti d'allevamento di galline ovaiole di cui alla direttiva 1999/74/CE del Consiglio. *GUCE L 30 del 31 Gennaio 2002.*

Accordo 6 febbraio 2003. Accordo tra il Ministro della salute Girolamo Sirchia, le regioni e le province autonome di Trento e di Bolzano in materia di benessere degli animali da compagnia e pet-therapy. *GU n. 51 del 3 Marzo 2003*

D.P.C.M. 28 febbraio 2003. Recepimento dell'accordo recante disposizioni in materia di benessere degli animali da compagnia e pet-therapy. *GU n. 52 del 4 marzo 2003.*

Decreto Legislativo 29 Luglio 2003 n. 267. Attuazione delle direttive 1999/74/CE e 2002/4/CE, per la protezione delle galline ovaiole e la registrazione dei relativi stabilimenti di allevamento. *GU n. 219 del 20 Settembre 2003.*

Decreto Legislativo 20 Febbraio 2004 n. 53. Attuazione della Direttiva 2001/93/CE che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini. *GU n. 49 del 28 Febbraio 2004.*

Delibera della Giunta Regionale dell'Emilia Romagna n. 2006/394 del 27/03/2006. Indicazioni tecniche in attuazione alla L. R. 2005/5 relativa alla tutela del benessere degli animali. *B.U.R n. 58 del 26.04.2006.*